
Strategien zur Optimierung von DNA-Vakzine Kandidaten gegen das humane Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1)

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR.RER.NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN- DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Alexandra Bojak aus Schongau
Dezember 2001

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen März 1998 und Dezember 2001 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.12.2001

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. G.Hauska
Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. Dr. H.R.Kalbitzer
	PD Dr. R.Wagner
	Prof. Dr. A.Kurtz

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....

Alexandra Bojak

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
A	Absorption oder Ampere
A	<i>Austria</i> , Österreich
aa.	Aminosäure (<i>amioacid</i>)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADCC	Antikörper-abhängige Zell-Zytotoxizität (<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARC	<i>AIDS related complex</i>
ARE	<i>A-rich element</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
BGH	Wachstumshormon des Rindes (<i>bovine growth hormone</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytoplasma
CA	Kapsid-Protein (<i>capsid</i>)
ca.	circa
CaP	Calciumphosphat (CaHPO_4)
cap	5'-Monomehtylguanosin-Kappe
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBC	<i>cap binding complex</i> (CBP80/CBP20)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CH	Schweiz
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
ConA	Concanavalin A
cpm	Impulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
Cy3	Cyaninfarbstoff Cy3
d	Desoxy
Da	Dalton
DAB	Diaminbenzoid
dam	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> (<i>dam</i> -Methylase)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Mod Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothretiol
E	Extinktion
E	Effektorzellen (<i>effector cells</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enzym chemolumineszenz</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titriplex III)
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERG	Eppendorff Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	é cétéra
EtOH	Ethanol
Exc	Extinktion
f	<i>forward</i> (Kurzbezeichnung für einen 5'-Primer)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gp	Glycoprotein
GSF	Gesellschaft für Strahlenforschung
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore Anlage
HA	Hämagglutinin
HBsAg	Hepatitis-B <i>surface antigen</i>
HeBs	HEPES <i>buffered saline</i>
HIV-1/2	Humanes Immunschwäche-Virus Typ 1/2
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle</i>
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merettich-Peroxidase)
HWZ	Halbwertszeit
i.A.	in Abhängigkeit
i.d.	intradermal
i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
i.p.	interperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
IR	<i>inhibitory region</i>
IS	<i>instability sequence</i>
ISS	<i>immunstimulatory sequence</i>
k	kilo
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L/l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide (Endotoxin)
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MAGI	<i>multi nuclear activation of β-galactosidase induction</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MeOH	Methanol
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major-histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MRC	<i>Medical Research Council</i> , UK
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger</i>)
MTP	Mirkotiterplatte

MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})
N	Nukleus
NaAc	Natriumacetat
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
NC	Nucleocapsid
Nef	negative regulator
NES	nuclear export signal
NL	Niederlande
NLS	nuclear localization signal
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren
NPC	nuclear pore complex (Zellkernporenkomplex)
nt	Nukleotide
NTR	non translated region (untranslatierte Region)
Nup	nuclear pore proteins (Zellkernporenproteine)
O.D.	Optische Dichte
OPD	Orthophenylenediamin-HCl
ori	origin of replication
OT	Objektträger
p	pico (10^{-12})
PABP	Poly(A)-binding protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	DNA-abhängige DNA-Polymerase; 3'-5'-Exonukleaseaktivität
pH	Konzentration der H^+ -Ionen in einer Lösung
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
pol	Polymerase
poly(A)	Kurzbezeichnung für polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten
PR	Protease
Pur	Purinbase (Adenin, Guanin)
Pyr	Pyrimidinbase (Thymin, Cytosin)
r	reverse (Kurzbezeichnung für einen 3'-Primer)
Rev	regulator of expression of viral proteins
RF	Rattenfaktor
Rip/Rab	Rev-interacting protein/Rev-activation domain binding protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RRE	Rev responsive element
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.k.	subkutan
SA	Spleiß-Akzeptor (3'-Spleißstelle)
SD	Spleiß-Donor (5'-Spleißstelle)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SFC	spot forming cell
SIV	Affen-Immundefizienz Virus
SR	arginin/serin-rich non-snRNP splicing factors
ss	einzelsträngig (single stranded)
Strep	Streptavidin
SV40	Simian Virus 40
T	Zielzellen (target cells)
TA	Tibialis anterior (Schienbeinmuskel)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAg	large T-Antigen (T= Transformation)
TAP	Transporterprotein des ERs
TAR	tat activating region
Tat	transactivator of transcription

TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TB-Medium	Terrific Broth-Medium
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TCID	<i>tissue culture infectious dosis</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzellen
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (<i>Tween-Tris Buffered Saline</i>)
TTP	Thymin-5-Triphosphat
U	Enzymeinheit (Units)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UK	<i>United Kingdom</i> , Großbritannien
ÜN	über Nacht
U-snRNP	<i>uracil-rich small nuclear ribonucleoproteins</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumenheit
V3	dritte variable Domäne des äußeren Hüllproteins HIV-gp120 ^{env}
vgl.	Vergleich
Vif	viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virus-ähnlicher Partikel (<i>virus-like particle</i>)
Vol.	Volumen
Vpr	virales Protein R
Vpu	virales Protein U
Vpx	virales Protein X
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Voleumeneinheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
C	Cystein	F	Phenylalanin
Q	Glutamin	P	Prolin
E	Glutaminsäure	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
D	Asparaginsäure	Z	Valin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Inhaltsverzeichnis	vii
Zusammenfassung	1
 A EINLEITUNG	 5
A.1 Morphologie reifer Viruspartikel	6
A.2 Der Replikationszyklus von HIV-1	7
Bindung von HIV an zelluläre Rezeptoren: Infektion der Zielzelle	7
Auflösung des viralen Kapsids (<i>Disassembly</i>), nukleärer Import und Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom	8
Regulation der viralen Genexpression	8
Expression HI-viraler Strukturproteine: Zusammenbau unreifer Virionen an der Plasmamembran (<i>Assembly</i>)	11
Knospung und Reifung der Virionen zu infektiösen HIV-Partikel	12
A.3 Klinik und Pathogenese der HIV-1 Infektion: Viruselimination durch antivirale Therapie ?	13
A.4 Die Entwicklung eines HIV-spezifischen Impfstoffes	14
Anforderungen an einen HIV-spezifischen Impfstoff	14
HIV-Impfstoff Kandidaten und Immunisierungsstrategien	15
A.5 DNA-Immunisierung: Mechanismen der Immuninduktion, Wirksamkeit und Risiken ..	17
Entwicklung eines neuartigen auf DNA basierenden Impfstoffes	17
Immunisierungsrouten und Verabreichungsform der DNA-Vakzine	18
DNA-Immunisierung: Mechanismen der Induktion einer Immunantwort	19
Vorteile und Risiken der DNA Immunisierung	22
A.6 Zielsetzung der Arbeit	23
 B MATERIAL UND METHODEN	 25
B.1 Reagenzien	25
B.2 Gentechnische Arbeitsmethoden	25
B.3 Allgemeine Zellkulturtechniken, Transfektion und Analyse der Genexpression in eukaryontischen Zellen	26
B.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken und Zelllinien	26

B.3.2	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	26
B.3.2.1	CaHPO ₄ ⁻ -Transfektionen adhärenter, eukaryontischer Zellen	27
B.3.2.2	Lipofektion von eukaryontischen Zellen	27
B.3.3	Analyse der transienten Proteinexpression.....	27
B.3.3.1	Gewinnung von Zellysaten	27
B.3.3.2	Bestimmung der Gesamtproteinmenge	27
B.3.3.3	Anreicherung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs).....	28
B.3.3.3.1	Aufreinigung von Virus-ähnlichen Partikeln.....	28
B.3.3.3.2	Gleichgewichtszentrifugation: Bestimmung der Dichte von VLPs.....	28
B.3.3.3.3	NaDoc-Fällung von Proteinen	28
B.3.3.4	Analyse transients Proteinexpression: SDS-PAGE und Western Blot Analyse	28
B.3.3.5	Quantifizierung der Pr55 ^{gag} Konzentration im ELISA	29
B.3.3.6	Immunpräzipitation transient exprimierter Proteine.....	30
B.3.3.7	„Luziferase Reporter Assay“: Quantifizierung der Luziferase Aktivität in den Zellysaten	30
B.3.3.8	„CAT Reporter Assay“: Quantifizierung der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Konzentration in den Zellysaten	30
B.3.3.9	Indirekter Nachweis der Tat Expression mit Hilfe der Indikatorzelle Hela-LTR-βGal („MAGI-Assay“).....	30
B.3.3.10	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
B.3.3.11	Analyse der Proteinexpression durch <i>in vivo</i> Markierung mit radioaktivem [³⁵ S]-Methionin	32
B.3.3.12	„Pulse-Chase“ Markierung: Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) exprimierter Proteine <i>in vivo</i>	32
B.3.4	Analyse des RNA-Exports: Isolierung und Nachweis spezifischer RNA-Transkripte (Northern Blot).....	33
B.3.4.1	Allgemeine Arbeitstechniken	33
B.3.4.2	Zellfraktionierung und Aufreinigung der RNA.....	33
B.3.4.3	Herstellung und Aufreinigung radioaktiver RNA-Sonden	33
B.3.4.4	Analyse der RNA: Northern Blot.....	34
B.4	Herstellung stabiler Zelllinien	34
B.5	Analyse der Proteinexpression durch gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation ..	35
B.6	Das Baculovirus Expression System: Aufreinigung Virus-ähnlicher Gag Partikel (VLPs) und löslicher Gag Proteine	35
B.6.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	35
B.6.1.1	Kultivierung von Insektenzellen.....	35
B.6.1.2	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	36
B.6.2	Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine	36
B.6.2.1	Produktion und Aufreinigung der Gag Partikel (VLPs)	36

B.6.2.2	Aufreinigung löslicher Gag Proteine aus Pr55 ^{gag} -VLPs mittels präparativer Gelelektrophorese (PrepCell®).....	37
B.7	Immunisierung der Versuchstiere und allgemeine immunologische Arbeitstechniken	37
B.7.1	Immunisierung der Versuchstiere	37
B.7.1.1	Präparation semi-steriler Endotoxin-freier Plasmid-DNA.....	38
B.7.1.2	Immunisierung der Balb/c-Mäuse	38
B.7.2	Analyse der humoralen Immunantwort	38
B.7.2.1	Gewinnung von Serum	38
B.7.2.2	Bestimmung der spezifischen Gesamt-Ig Antikörpertiter.....	38
B.7.2.3	Bestimmung der Antikörper-Isotypen.....	39
B.7.3	Analyse der zellulären Immunantwort.....	39
B.7.3.1	Kultivierung primärer Splenozyten	39
B.7.3.2	Präparation der Milz und Isolierung der Splenozyten	39
B.7.3.3	Präparation von ConA-aktiviertem Zellkulturüberstand	40
B.7.3.4	<i>In vitro</i> Restimulation der Splenozyten: Quantifizierung der Zytokinsekretion (ELISA) 40	
B.7.3.5	ELISPOT-Assay: Quantifizierung Zytokin sezernierender Zellen.....	40
B.7.3.6	Bestimmung der CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellantwort	41
B.7.3.6.1	<i>In vitro</i> Restimulation Peptid-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	41
B.7.3.6.2	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest („ ⁵¹ Cr-Release Assay“).....	41
B.7.4	Erfassung von immunogenen B,- und T-Zellepitopen	42
B.7.4.1	Identifizierung muriner, Tat-spezifischer B-Zellepitope.....	42
B.7.4.2	Identifizierung muriner Tat-spezifischer T Zellepitope	42
C	ERGEBNISSE	45
C.1	Grundlegende Untersuchungen zur Expression des HI-viralen Strukturproteins Gag in Nagetierzellen.....	45
C.1.1	Reduzierte Expression INS-haltiger, Gag-spezifischer Gene in Nagetierzellen.....	46
C.1.1.1	Gag Expression in verschiedenen Nagetierzellen	46
C.1.1.2	Synthese und Export Gag-spezifischer RNA in Nagetierzellen	47
C.1.1.3	Expression und nukleäre Lokalisation des Rev Proteins.....	48
C.1.1.4	Gag Expression und RNA-Export in stabilen Rev ^{gfp} -Zelllinien.....	49
C.1.1.4.1	Herstellung und Charakterisierung stabiler Rev ^{gfp} -Zelllinien.....	49
C.1.1.4.2	Analyse der Pr55 ^{gag} Expression und des RNA-Exports	49
C.1.1.5	Zusammenfassung.....	50
C.1.2	Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs) in Nagetierzellen	50
C.1.2.1	Gag Expression und Freisetzung von Pr55 ^{gag} -VLPs	51
C.1.2.2	Bestimmung der Dichte freigesetzter Pr55 ^{gag} -VLPs	52
C.1.3	Expression, Partikel Freisetzung und Prozessierung der Gag und Gagpol Vorläuferproteine in Nagetierzellen.....	52

C.1.3.1	Der ribosomale Leserastersprung ist in Nagetierzellen funktionell	52
C.1.3.2	Intrazelluläre und intrapartikuläre Prozessierung der Pr55 ^{gag} bzw. Pr160 ^{gagpol} Vorläuferproteine in Nagetierzellen	53
C.1.4	Zusammenfassung	55
C.2	DNA-Immunisierung: vergleichende immunologische Studien im Balb/c-Mausmodell	56
C.3	Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell	58
C.3.1	Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine	58
C.3.1.1	Dosisabhängigkeit der humoralen Immunantwort	58
C.3.1.2	Humorale und zelluläre Immunantwort	58
C.3.1.3	Dauer der induzierten Immunantwort	61
C.3.1.4	Zusammenfassung	61
C.3.2	Einfluß interner CpG-Motive auf die Immunogenität der syngag DNA-Vakzine	62
C.3.3	Vergleich unterschiedlicher Immunisierungsrouten und Verabreichungsformen der syngag DNA-Vakzine	63
C.3.3.1	Injektion der Plasmid-DNA in unterschiedliches Muskelgewebe	63
C.3.3.2	Subkutane (s.k.) versus intramuskuläre (i.m.) DNA-Immunisierung	63
C.3.3.3	Immunisierung „nackter“ Plasmid-DNA versus Lipid-komplexierter DNA (Liposomen)	64
C.3.3.4	Zusammenfassung	66
C.3.4	DNA-Vakzine versus Immunisierung Virus-ähnlicher Partikel	66
C.3.4.1	Vergleichende „DNA-Prime/Protein-Boost“-Strategien	66
C.3.4.2	Immunstimulatorische Eigenschaften der Pr55 ^{gag} -VLPs <i>in vitro</i>	68
C.3.4.3	Immunstimulatorische Eigenschaften der Pr55 ^{gag} -VLPs <i>in vivo</i>	68
C.3.4.4	Zusammenfassung	69
C.4	Einfluß der Antigen Lokalisation auf die Immunogenität einer DNA-Vakzine	71
C.4.1	Konstruktion der Expressionskonstrukte	71
C.4.2	Analyse der Proteinexpression und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs)	72
C.4.3	Vergleichende immunologische Studien <i>in vivo</i>	74
C.4.3.1	Einfluß der V3-Schleife auf die Immunogenität <i>in vivo</i>	74
C.4.3.2	Einfluß der Partikelfreisetzung auf die Immunogenität <i>in vivo</i>	75
C.4.4	Zusammenfassung	76
C.5	Modulation der Immunantwort: gerichteter Transport viraler Antigene in das Endoplasmatische Retikulum	77
C.5.1	Konstruktion der Expressionskonstrukte	77
C.5.2	Expressionanalyse und subzelluläre Lokalisierung viraler Antigene in eukaryontischen Zellen	78
C.5.2.1	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation®	78
C.5.2.2	ER-Lokalisation modifizierter HI-viraler Antigene	79
C.5.2.3	Sekretion modifizierter HI-viraler Antigene	81

C.5.3	Einfluß einer veränderten, zellulären Lokalisation und Sekretion HI-viraler Antigene auf die Immunogenität <i>in vivo</i>	82
C.5.3.1	Zytoplasmatische versus sekretorische Antigene.....	82
C.5.3.2	Partikuläres versus sekretorisches Antigen.....	83
C.5.3.3	Einfluß der zytoplasmatischen p40* Gag-Isoform auf die Immunogenität antigener Sekretproteine	84
C.5.4	Zusammenfassung	85
C.6	DNA-Vakzinierung von „Minigenen“: Induktion isolierter CD8⁺ zytotoxischer T-Zellantworten.....	86
C.6.1	Konstruktion der „Minigene“ und Beschreibung der Expressionskonstrukte.....	86
C.6.2	Immunogenität von Minigenen <i>in vivo</i>	87
C.7	Verbesserung der zytotoxischen T-Zellantwort durch Erhöhung intrazellulärer Degradationsereignisse	89
C.7.1	Einfluß von Ubiquitin-Konjugation sowie der „N-End“ Regel auf die Degradation des Gag Proteins	89
C.7.1.1	Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte	90
C.7.1.2	Expressionsanalyse Ubiquitin-konjugierter viraler Antigene.....	92
C.7.1.3	Bestimmung der Halbwertszeit <i>in vivo</i> exprimierter Proteine	93
C.7.2	Einfluß eines C-terminalen PEST-Degrone auf die Stabilität viraler Antigene	94
C.7.2.1	Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte	94
C.7.2.2	Analyse der Expression PEST-konjugierter Proteine	95
C.7.3	Einfluß gezielter Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität viraler Antigene.....	95
C.7.3.1	Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte	95
C.7.3.2	Expressionsanalyse mutierter viraler Antigene.....	96
C.7.4	Zusammenfassung	97
C.8	Immunogenität myogener DNA-Vakzine Vektoren.....	99
C.8.1	Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte	99
C.8.1.1	Klonierung der Luziferase-Reporterkonstrukte	100
C.8.1.2	Klonierung der HIV-1 Pr55 ^{gag} und p24 ^{KA} Expressionskonstrukte	101
C.8.2	Zellspezifität und vergleichende Expressionsanalysen myogener DNA-Vakzine Vektoren	101
C.8.2.1	Charakterisierung der murinen, myogenen Zelllinie C ₂ C ₁₂	101
C.8.2.2	Vergleich der Aktivität und Zellspezifität der Promotoren	101
C.8.2.3	Einfluß von IFN- γ auf die Aktivität der Promotoren	102
C.8.2.4	Promotorabhängige Expression viraler Antigene	103
C.8.3	Einfluß gewebespezifischer Expression viraler Antigene auf die Immunogenität <i>in vivo</i>	104
C.8.3.1	Die Stärke des Promotors korreliert mit der Immunogenität <i>in vivo</i>	104
C.8.3.2	Die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren ist abhängig von Freisetzung des Antigens	105
C.8.4	Zusammenfassung	107

C.9	Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das regulatorische HI-virale Tat Protein	108
C.9.1	Konstruktion und Beschreibung der Expressionsvektoren	108
C.9.2	Analyse der Genprodukte der DNA Vakzine Vektoren	109
C.9.2.1	Analyse der Tat Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	109
C.9.2.2	Lokalisation des Wildtyp,- und „Scrambled“-Tat Proteins	111
C.9.2.3	Analyse der trans-aktivierenden Eigenschaften <i>in vivo</i>	111
C.9.3	Vergleichende Immunogenität der Tat-spezifischer DNA Vakzine Kandidaten <i>in vivo</i>	112
C.9.3.1	Induktion Tat-spezifischer humoraler Immunantworten	113
C.9.3.2	Induktion Tat-spezifischer zellulärer Immunantworten <i>in vivo</i>	114
C.9.3.3	Identifizierung und Vergleich immunogener Epitope.....	114
C.9.4	Zusammenfassung.....	115
D	DISKUSSION.....	117
D.1	Voraussetzungen zur Entwicklung geeigneter DNA-Vakzine Kandidaten für verschiedene Tiermodelle	117
D.1.1	Genexpression HI-viraler Strukturproteine in Nagetierzellen.....	118
D.1.1.1	Inhibition der Rev/RRE-abhängigen Gag Expression in Nagetierzellen	118
D.1.1.2	Inhibition der CTE-abhängigen Gag Expression in Nagetierzellen.....	120
D.1.1.3	Konstitutive Gag Expression des Kodon-optimierten Gens	121
D.1.2	Partikelfreisetzung und Prozessierung der Strukturproteine Gag und Gagpol in Nagetierzellen	122
D.1.2.1	Effiziente Abschnürung und Freisetzung Virus-ähnlicher Gag-Partikel in verschiedenen Zellkultursystemen	122
D.1.2.2	Effiziente Prozessierung freigesetzter Pr55 ^{gag} /Pr160 ^{gagpol} Virus-ähnlicher Partikel in verschiedenen Zellkultursystemen	123
D.1.3	Inhibition der HI-viraler Replikation in Nagetierzellen	124
D.1.4	Die Expressionsrate von Gag korreliert mit der Immunogenität der DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell	125
D.2	Immunogenität des Kodon-optimierten Gag-spezifischen DNA-Vakzine Kandidaten pc-syngag	126
D.2.1	Die Bedeutung des Gag Proteins für eine HIV/AIDS-Vakzine	126
D.2.2	Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine	127
D.2.2.1	Induktion effizienter humoraler und zellulärer Immunantworten	127
D.2.2.2	Induktion langlebiger Antigen-spezifischer Gedächtniszellen	128
D.2.2.3	Interne CpG-Motive besitzen keinen Einfluß auf die Immunogenität.....	128
D.2.2.4	Immunisierungsrouten und Verabreichungsformen der DNA-Vakzine	129
D.2.2.4.1	Die Immunisierungsmethode beeinflusst die Effektivität der DNA-Vakzine	129
D.2.2.4.2	Die Immunisierungsrouten beeinflusst die Effektivität der Immunantwort.....	130
D.2.2.4.3	Die Art der Immunisierung beeinflusst die Polarisierung der Immunantwort.....	130
D.2.2.4.4	Liposomen erhöhen die Effektivität der DNA-Vakzine	131

D.2.2.5	DNA-Vakzine versus Immunisierung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs).....	131
D.2.2.5.1	Der Vorteil von „DNA-Prime/Protein-Boost“ Strategien	132
D.2.2.5.2	Pr55 ^{gag} -VLPs als Komponente eines kombinatorischen HIV/AIDS-Vakzine Konzepts	132
D.2.2.6	Insertion zusätzlicher immunogener Polypeptide	133
D.3	Strategien zur Modulation und Optimierung des pc-syngag Expressionsvektors.....	134
D.3.1	Modulation der zellulären Lokalisation und die Auswirkungen auf die <i>Immunogenität in vivo</i>	134
D.3.1.1	Die Pr55 ^{gag} -Partikelfreisetzung <i>in vivo</i> hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Immunogenität der Gag-spezifischen DNA-Vakzine	134
D.3.1.2	Das zytoplasmatisch lokalisierte Kapsidantigen erhöht die p24-spezifische CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellantwort <i>in vivo</i>	135
D.3.1.3	Zielgerichteter Transport HI-viraler Antigene in das ER: Immunogenität sekretorischer Antigene	136
D.3.1.3.1	Generierung sekretorischer HI-viraler Antigene.....	136
D.3.1.3.2	Sekretorisches p24 ^{KA} induziert eine T _H 2-polarisierte Immunantwort <i>in vivo</i>	137
D.3.1.3.3	Sekretorisches Gag Protein induziert eine effiziente T _H 2-polarisierte humorale und zelluläre Immunantwort	137
D.3.1.3.4	Das Syntheseprodukt der internen Translationsinitiation p40* ist essentiell für die Induktion einer p24-spezifischen CD8 ⁺ ZTL-Antwort	138
D.3.2	„Minigen-Immunisierung“: Induktion einer Epitop-spezifischen CD8 ⁺ zytotoxischen T- Zellantwort <i>in vivo</i>	139
D.3.2.1	Induktion einer isolierten zytotoxischen T-Zellantwort	140
D.3.2.2	Immundominanz HI-viraler Epitope.....	141
D.3.3	Entwicklung einer CD8 ⁺ T-Zell DNA-Vakzine: Optimierung der MHC-Klasse I Präsentation durch Modulation der Antigene.....	142
D.3.4	Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren	143
D.3.4.1	Die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine korreliert mit der Aktivität des Promotors.....	144
D.3.4.2	Die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren ist abhängig von der Freisetzung des exprimierten Antigens <i>in vivo</i>	145
D.3.4.3	IFN- γ reprimiert die Aktivität konstitutiver und zellulärer Promotoren	145
D.4	Entwicklung und Evaluierung neuer DNA-Vakzine Kandidaten gegen das HI-virale Tat Protein.....	147
D.4.1	Impfstoffe gegen toxische Antigene und Virulenzfaktoren	147
D.4.2	Entwicklung effizienter DNA-Vakzine Kandidaten gegen das regulatorische HIV-1 Tat Protein	147
D.4.2.1	Die Bedeutung einer Tat-spezifischen Vakzine	147
D.4.2.2	Optimierung der Tat Expression durch Adaption des Kodongebrauchs.....	148
D.4.2.3	Die Kodon-Optimierung erhöht die Immunogenität der Tat-spezifischen DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell.....	149

D.4.2.4	B-Zell Epitope und neutralisierende Eigenschaften der Antikörper	149
D.4.2.5	Erhöhung der Sicherheit durch das „ <i>Scrambling</i> “ des <i>tat</i> Gens.....	150
D.4.2.5.1	Das „ <i>Scrambled</i> “ Tat Protein ist biologisch inaktiv.....	150
D.4.2.5.2	Die „ <i>Scrambled</i> “-Tat DNA-Vakzine induziert eine effiziente Wildtyp Tat- spezifische, zelluläre Immunantwort <i>in vivo</i>	151
D.4.3	Die Tat-spezifische DNA-Vakzine als Komponente eines kombinierten HIV/AIDS- Vakzine Konzepts.....	152
D.5	Ausblick: HIV/AIDS-Vakzine 2002.....	153
E	LITERATURVERZEICHNIS.....	155
	Veröffentlichungen	187
	Vorträge bei nationalen sowie internationalen Kongressen.....	187
	Posterpräsentationen bei nationalen sowie internationalen Kongressen	187
	Auszeichnung-Posterpreis	188
	Danksagung	189
	Lebenslauf.....	190

Zusammenfassung

Keine der weltweit entwickelten, gängigen HIV/AIDS-Impfstoffkandidaten konnte bislang eine umfassend schützende Immunantwort gegen das humane Immundefizienzvirus HIV-1 *in vivo* garantieren. Eine neuartige, vielversprechende Immunisierungsmethode stellt u.a. die DNA-Immunisierung dar, welche in der Lage ist sowohl eine effiziente humorale als auch zelluläre Immunantwort gegen das entsprechende Genprodukt zu induzieren. Diesbezüglich war die Entwicklung, Charakterisierung und immunologische Evaluierung verschiedener DNA-Vakzine Kandidaten im Balb/c-Mausmodell Gegenstand dieser Arbeit. Dabei sollten zusätzlich Strategien entwickelt werden, um die *in vivo* induzierten Immunantworten zu modulieren, die Sicherheit der DNA-Vakzine zu erhöhen und somit generell die Effizienz der DNA-Immunisierung zu optimieren.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, daß, aufgrund der zeitlich regulierten Genexpression HI-viraler Proteine die Expression des Gag Polyproteins von der Anwesenheit des trans-aktiven, viralen Exportfaktors Rev sowie cis-aktiver viraler RNA-Elemente (5'-UTR; 3'-RRE) abhängig ist. Ferner konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß eine Rev/RRE-unabhängige Gag Expression ebenso durch alternative cis-aktive Exportelemente, wie z.B. dem retroviralem CTE-Element, sowie durch Adaption des HI-viralen Kodon-Gebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen gewährleistet werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte demgegenüber demonstriert werden, daß die Rev/RRE,- bzw. die CTE-vermittelte Gag Expression, im Vergleich zu Primatenzellen, in einer Vielzahl von Nagetierzellen ineffizient ist. Demnach weisen die retroviralen RNA-Exportmechanismen eine Zellspezifität auf, wodurch eine weitere, mögliche Erklärung der bereits bekannten Inhibierung der HI-viralen Replikation in Nagetieren begründet sein könnte. Eine effiziente und konstitutive Gag Expression wurde dagegen mit Hilfe des Kodon-optimierten *syngag* Gens erzielt, wobei ferner die Abschnürung und Freisetzung Virus-ähnlicher Gag Partikel (Pr55^{gag}-VLP) in allen Nagetierzellen gewährleistet wurde. Nach i.m. DNA-Immunisierung der verschiedenen Gag-spezifischen Expressionsvektoren wurde deutlich, daß die zuvor ermittelte Expressionsrate in murinen Zellen direkt mit der *in vivo* induzierten Immunantwort korreliert. Infolgedessen scheint das pc-*syngag* Expressionskonstrukt ein geeigneter DNA-Vakzine Kandidat zu sein. So konnte weiterhin im murinem Balb/c-Mausmodell gezeigt werden, daß die i.m. Immunisierung der Kodon-optimierten pc-*syngag* DNA-Vakzine bereits bei geringen, applizierten Konzentrationen und einer einmaligen Auffrischimpfung, hohe Gag-spezifische Antikörper-Titer, eine T_H1-polarisierte zelluläre Immunantwort, sowie Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen *in vivo* induziert, die noch mehrere Monate nach der letzten Vakzinierung nachgewiesen werden konnten. Die Effizienz der Immunantwort war dabei von der verabreichten Dosis der Plasmid-DNA und der Anzahl der Auffrischimpfungen abhängig. Die internen, als immunstimulatorische Sequenzen beschriebenen CpG-Motive der *syngag* Genkassette, besitzen dagegen keinen Einfluß auf die hohe Immunogenität der pc-*syngag* DNA-Vakzine *in vivo*. Während sich die Effizienz einer subkutanen und einer intramuskulären Verabreichung nackter Plasmid-DNA nicht wesentlich voneinander unterscheidet, konnte dagegen die Gag-spezifische Immunogenität, unabhängig von der Immunisierungsrouten, durch die Immunisierung mit Liposomen-komplexierter Plasmid-DNA signifikant erhöht werden. Zusammenfassend wurde die von zellulären Faktoren unabhängige, hohe Immunogenität der Kodon-optimierten pc-*syngag* DNA-Vakzine im Vergleich zu herkömmlichen Gag-spezifischen Expressionsmodulen demonstriert, welche eine ebenso effiziente Immunantwort induzierte wie hoch-immunogene Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel.

Neben der Erhöhung der Immunogenität durch die Optimierung des Kodon-Gebrauchs, wurde weiterhin gezeigt, daß eine Modulation der Eigenschaften bzw. der Lokalisation der *in vivo* exprimierten HI-viralen Antigene einen wesentlichen Einfluß auf die induzierten Immunantworten besitzt. So konnte durch Inhibition der Partikelfreisetzung die humorale Immunantwort, und durch die *in vivo* Expression des zytoplasmatischen 24kDa Kapsidproteins, einem Spaltprodukt des Gag Vorläuferproteins, die p24-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort gesteigert werden. Durch Anfügen einer ER-Signalsequenz, wodurch die HI-viralen Antigene Gag und p24^{KA} ko-translational in das Endoplasmatische Retikulum transloziert und *in vivo* als Sekretproteine freigesetzt wurden, konnte eine T_H2-polarisierte Immunantwort induziert werden. Diese war gekennzeichnet durch lediglich geringfügig erhöhte AK-Titer und einer signifikant reduzierten, zellulären und p24-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort. In diesem Zusammenhang konnte ferner gezeigt werden, daß das zytoplasmatisch lokalisierte Syntheseprodukt einer internen ribosomalen Translationsinitiationsstelle p40*, wesentlich an der Induktion einer p24-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort *in vivo* beteiligt ist.

Ein weiteres Projekt umfaßte die Entwicklung von Strategien zur Erhöhung der MHC-Klasse I restringierten, Gag-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort. Da die Präsentation der mit den MHC-Klasse I Molekülen assoziierten ZTL-Epitope u.a. von der Effizienz der proteasomalen Antigen-Degradation im Zytoplasma abhängt, wurde zu diesem Zweck auf unterschiedlichem Wege versucht, die Stabilität der HI-viralen Strukturproteine Gag bzw. p24^{KA} nachhaltig zu beeinflussen und einer effizienten proteasomalen Degradation zuzuführen. Allerdings konnte weder durch Ubiquitin-Modifikationen, destabilisierender N-terminaler Aminosäuren, integrierten Degrons, sowie singulären Aminosäuresubstitutionen, die Halbwertszeit der Antigene merklich beeinflußt werden. Aus diesem Grund wurde hierbei auf weitere Immunisierungsstudien verzichtet. In diesem Zusammenhang konnte außerdem gezeigt werden, daß durch die Immunisierung monovalenter Minigene, deren Genprodukte mit einer ER-Signalsequenz modifiziert wurden und aufgrund einer TAP-unabhängigen Translokation der singulären, murinen ZTL-Epitope in das ER gelangen, eine isolierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort *in vivo* induziert werden kann. Die Effizienz der Minigene war dabei von dem jeweiligem Epitop selbst und von dessen immundominanten bzw. immunrezessiven Eigenschaften, abhängig. Insbesondere für toxische Genprodukte würde die Immunisierung mit entsprechenden, immunogenen Minigenen einen großen Sicherheitsvorteil bieten. Ferner könnte mit Hilfe dieser Methode gezielte ZTL-spezifische Immunreaktionen stimuliert, und die Immuninduktion alternativer Immunisierungsstrategien unterstützend gefördert werden.

Zur Erhöhung der Sicherheit zukünftiger DNA-Vakzine Kandidaten, sollte ferner die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren im Vergleich zu herkömmlichen DNA-Vakzine Vektoren, welche im Gegensatz zu der muskelspezifischen, eine konstitutive Expression des Fremdatigens erlauben, *in vitro* und *in vivo* vergleichend evaluiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Genexpression durch den murinen MCK-Promotor zwar abhängig vom Zelltyp und dem Differenzierungsstadium der Muskelzelle reguliert wird, allerdings die Expressionsrate im Vergleich zu dem konstitutivem, viralen hCMV-Promotor, um 50% reduziert ist. Erwartungsgemäß korrelierte auch nach i.m. Immunisierung der Versuchstiere, die Immunogenität der Gag-spezifischen DNA-Vakzine mit der Expressionsrate und infolgedessen mit der Aktivität des jeweiligen Promotors. Ferner wurde demonstriert, daß die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren, aufgrund der Notwendigkeit von „Cross-Priming“-Effekte zur Immuninduktion, von der Freisetzung des *in vivo* exprimierten Antigens *in vivo* abhängt. Obwohl die Aktivität beider Promotoren durch das pro-inflammatorische Zytokin IFN-γ negativ beeinflusst wird, und die Immunogenität der Gag-spezifischen myogenen DNA-Vakzine Vektoren signifikant reduziert ist,

erhöhen derartige, regulierbare Vektorsysteme, deren Effektivität sicherlich, z.B. durch Modulation der Antigen Lokalisation, noch gesteigert werden kann, die Sicherheit der DNA-Immunisierung.

Aus zahlreichen klinischen Studien geht hervor, daß die Progression von AIDS invers mit einer effizienten humoralen als auch zellulären Immunantwort gegen das in seinen immundominanten Regionen stark konservierte 14kDa Tat Nukleoprotein, welches essentiell für die effiziente Transkription virale pre-mRNA ist, korreliert. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung und Evaluierung einer sicheren und effizienten DNA-Vakzine gegen das virale Regulatorprotein Tat.

Dabei konnte gezeigt werden, daß durch die Adaption des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen, die Tat Expression und infolgedessen die Immunogenität der DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell deutlich gesteigert wird. Die Ursachen der signifikanten Erhöhung der Expressionsrate insbesondere in murinen Zellen, die vermutlich auf Ebene der nukleären Stabilität begründet ist, sind allerdings im Detail unbekannt. Die durch die synthetische DNA-Vakzine induzierten Tat-spezifischen Antikörper erkannten, wie auch die in der Literatur beschriebene neutralisierenden Antikörper, vornehmlich die N-terminale (1-20 aa.) sowie die zentrale Domäne (41-70 aa.) des Tat Proteins. Im Zusammenhang mit der Erhöhung der Sicherheit herkömmlicher Tat-spezifischer DNA-Vakzine Kandidaten konnte ferner durch ein neuartiges Verfahren, welches auf einer Fragmentierung der Aminosäuresequenz und abgeänderter Verknüpfung der dadurch generierten Peptidfragmente, besteht, eine „Scrambled“ tat Gen generiert werden, welches unabhängig von zelltypspezifischen Faktoren exprimiert wurde und dessen Genprodukt im Zellkern lokalisiert werden konnte. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß das „Scrambled“ Tat Protein, im Vergleich zum Wildtyp Tat Protein, biologisch inaktiv ist. Obwohl diese pc-scratat DNA-Vakzine nur geringe Tat-spezifische Antikörper-Titer *in vivo* induzierte, konnten effiziente und hohe zelluläre Immunreaktionen detektiert werden. Es ist durchaus vorstellbar, daß eine Kombination dieser sicheren Tat-spezifischen DNA-Vakzine und eines chemisch inaktivierten Tat Toxoids eine umfassende und effiziente humorale und zelluläre Immunantwort in zukünftigen Immunisierungsstudien induziert. Ferner bietet dieses Verfahren die Möglichkeit zur Entwicklung von effizienten DNA-Vakzine Kandidaten, die insbesondere gegen z.B. toxische virale oder bakterielle Virulenzfaktoren gerichtet sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine Optimierung des Kodongebrauchs und einer infolgedessen erhöhten Expressionsrate *in vivo*, eine hoch-immunogene Gag,-bzw. p24^{KA}-spezifische und eine Tat-spezifische DNA-Vakzine generiert werden. Die vorgestellten Strategien zur Optimierung und gezielten Modulation der durch DNA-Immunisierung induzierten humoralen und zellulären Immunantwort, tragen ferner nicht nur wesentlich zum Verständnis der Mechanismen der Immuninduktion bei, sondern stellen bereits die Grundlage zur Entwicklung sicherer, effektiver und immunogener HIV/AIDS-Impfstoffe zur Austestung in prä-klinischen und humanen Studien der Phase I/II dar.

A Einleitung

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO und UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) sind gegenwärtig **40 Millionen** Menschen mit dem humanem Immundefizienz Virus HIV (*human immunodeficiency virus*), dem Erreger der Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immune deficiency syndrom*) infiziert. Seit dem Ausbruch der Erkrankung starben bislang über **18,8 Millionen** Menschen an den Folgen ihrer HIV Infektion. Pro Jahr werden schätzungsweise weitere 5 Millionen Menschen mit dem tödlichen Virus infiziert. Über die Hälfte aller erfaßten, infizierten Menschen lebt in **Zentralafrika**. Neben Afrika, sind weltweit zahlreiche Gebiete Süd- bzw. Südost Asiens, des südamerikanischen Kontinents und auch Osteuropas am stärksten von der HIV-Epidemie betroffen. In Deutschland leben zum gegenwärtigen Zeitpunkt etwa 37.000 Träger des HI-Virus.

Die erste Dokumentation einer vermeintlichen HIV-Infektion handelte von einem norwegischen Matrosen, der sich vermutlich **1966** infizierte und –ebenso wie seine Frau und Kinder- 1976 an den Folgen der für AIDS typischen Erkrankungen verstarb (Froland et al. 1988; Jonassen et al., 1997). Im Jahr **1982** wurden dann die ersten Berichte über Patienten mit AIDS-ähnlichen Symptomen in den U.S.A. veröffentlicht. Nur kurze Zeit später wurde schließlich der virale Erreger, HIV-1, erstmals aus Blut-Lymphozyten isoliert (Barré-Sinoussi et al., 1983). Afrikanische Primaten sind die **natürlichen Wirte** des SI-Virus (SIV, *simian immunodeficiency virus*), welches ebenso wie die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 zur Gruppe der **Lentiviren** (Familie: *Retroviridae*) gehört. Während sich das ausschließlich in Westafrika verbreitete und nur schwach humanpathogene Virus **HIV-2** vermutlich aus dem Isolat SIVsm entwickelte, dessen natürlicher Wirt die in dieser Region beheimatete Mangaben (*Cercocebus atys atys*) sind, ist der Ursprung des phylogenetisch divergenten HIV-1 noch ungeklärt. Die engsten, bislang identifizierten Verwandten von HIV-1 sind die aus **Schimpansen** (*Pan troglodytes troglodytes*) isolierten SIVcpz Isolate SIVcpzGab1 (Huet et al., 1990), SIVcpzUS (Gao et al., 1999) und SIVcpzCam3 (Corbet et al., 2000). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird aufgrund der bisherigen Ergebnisse phylogenetischer Studien vermutet, daß die Übertragung eines dieser SIV Isolate vom Menschenaffen auf den Menschen vor etwa 50-60 Jahren in Afrika stattgefunden haben muß und diese erstmalige **Zoonose** den Ursprung der heutigen HIV-1/AIDS-Pandemie darstellt (Ho et al., 1998). Der weltweit am verbreitetste **HIV-1 Stamm M** („*major*“; „Montagnier“) wird wiederum in mehr als neun **Subtypen** (A, B, C, D, F, G, H, J und K) unterteilt. Von der in einigen wenigen Ländern, wie z.B. Kamerun oder Gabon, vertretenen **Gruppe 0** („*outlier*“) existieren nur drei Subtypen. Eine dritte HIV-1 Gruppe, die als **Stamm N** („*non-M, non-O*“) bezeichnet wird, wurde bislang nur aus zwei, in Kamerun lebenden Personen isoliert. Mittlerweile werden immer neue Varianten und auch **rekombinante Mosaik-Viren**, wie z.B. A/G oder AE/B, B/C oder F/D rekombinante HI-Viren, aus den in Risikogebieten lebenden HIV Patienten isoliert und beschrieben (McCutchan et al., 1999, Tovanabutra et al., 2001, Piyasirisilp et al. 2000, Laukkanen et al., 2000, Su et al., 2000).

A.1 Morphologie reifer Viruspartikel

Zwischen HIV-1 und HIV-2, sowie den einzelnen Subtypen bestehen elektronenmikroskopisch keine Unterschiede. HIV ist ein etwa 100-140nm Durchmesser großer, von einer Lipid-Doppelschicht umgebener, kugelförmiger bis ikosaedrischer Lipoproteinpartikel (Munn *et al.*, 1985; Gelderblom *et al.* 1987, 1989 und 1991). Die Virushülle besteht aus Lipiden und zahlreichen anderen Komponenten der Wirtszellmembran, wie z.B. HLA-Molekülen und Komplementfaktoren (Aloia *et al.*, 1993; Gelderblom *et al.*, 1987; Arthur *et al.*, 1992; Meerloo *et al.*, 1993), in der das virale, glykosylierte **Transmembranprotein gp41** (TM; *transmembran*) integriert ist. Das virale externe **Glykoprotein gp120** (SU; *surface*) bindet nicht-kovalent durch hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen an gp41, wobei die viralen Hüllproteine trimere Komplexe in streng symmetrischer Anordnung auf der Oberfläche des Viruspartikels ausbilden (Schawaller *et al.*, 1989; Pinter *et al.*, 1989; Earl *et al.*, 1990; Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998). An der Innenseite der Virushülle befindet sich ein geometrisches Gerüst aus etwa tausend **Matrixproteinen (p17^{MA})**. Diese sind durch einen Myristyl-Anker, einer gesättigten Fettsäure aus 14 Kohlenstoffatomen, kovalent in der Lipidmembran verankert (Henderson *et al.*, 1992; Veronese *et al.*, 1988; Göttlinger *et al.*, 1989).

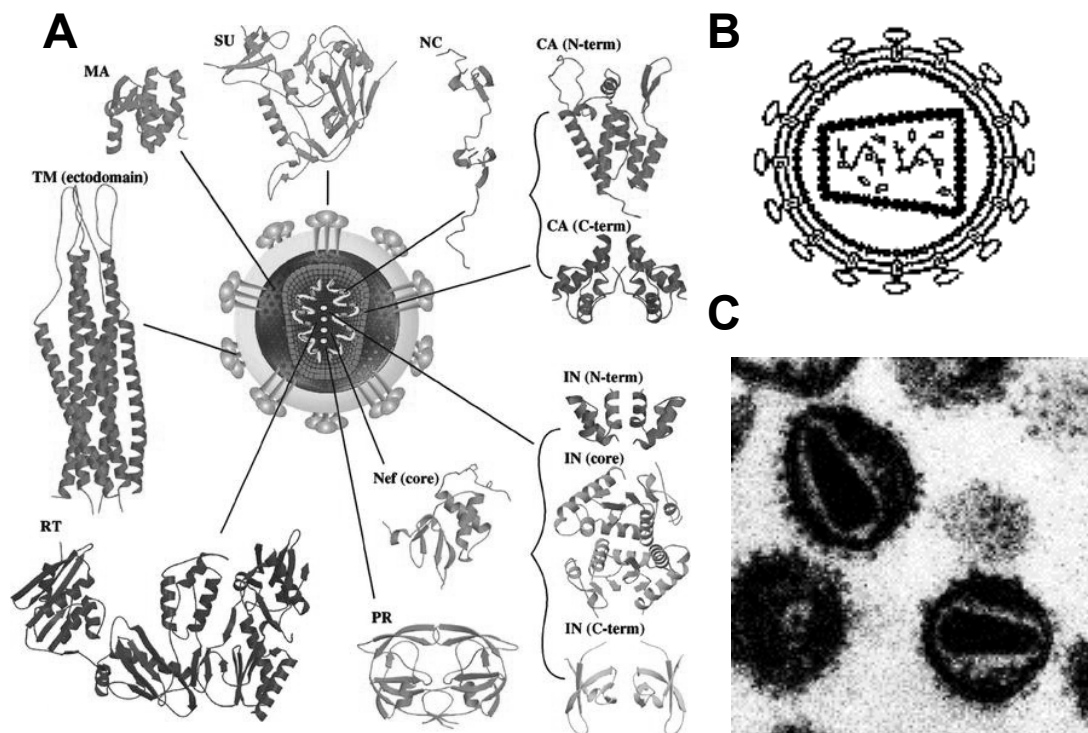


Abbildung A-1 Die Morphologie reifer HIV-1 Viruspartikel. (A) Darstellung der bislang bekannten Sekundärstrukturen der im Virion enthaltenen viralen Proteine sowie (B) schematische Darstellung des reifen HIV Virions. (C) In der elektronenmikroskopischen Aufnahme infektiöser Viruspartikel ist deutlich das von einer Hüllmembran umgebene, konische Kapsid zu erkennen. (MA = Matrixprotein p17; CA = Kapsidprotein p24; NC = Nukleokapsidprotein p7; RT = Reverse Transkriptase p51; PR = Protease p11; IN = Integrase p32; TM = Transmembranprotein gp41; SU = Hüllprotein gp120 (modifiziert nach Turner und Summers, 1999))

Innerhalb des Viruspartikels befindet sich ein konisches Kapsid, welches aus etwa 1200-2000 Molekülen des **Kapsidproteins p24^{KA}** besteht. Die **Verbindungs-Proteine (p6^L, link protein)**, welche bislang nur für HIV dokumentiert werden konnten, sind zwischen der Virushülle und dem

viralen Kapsid lokalisiert und verbinden die Schicht der Matrixproteinen mit dem schmalen, etwa 20nm im Durchmesser großem Ende des Viruskapsids (Gelderblom, 1991). Das Kapsid selbst umschließt das **HI-virale Genom**, wobei jeder Viruspartikel zwei Moleküle des einzelsträngigen HI-viralen RNA Genoms enthält (Marquet et al., 1991). Des weiteren befinden sich neben Molekülen der **Reversen Transkriptase (p51^{RT})** mit RNase H (p66), des **Nukleokapsidproteins (p7^{NC})** und zwei für die Initiation der reversen Transkription erforderlichen zellulären t_{Lys}-RNA Molekülen, die viralen Enzyme **Integrase (p32^{IN})** und **Protease (p11^{PR})** im Partikel. Weiterhin sind das virale, regulatorische Protein **Nef** (Welker et al., 1996; Bukovsky et al., 1997), die akzessorischen Proteine **Vpr** (Lu et al., 1993; Paxton et al., Wang et al., 1994) und **Vif** (Liu et al., 1995; Camaur und Trono, 1996; Fouchier et al., 1996; Karczewski und Strebel, 1996) und etwa 150-200 Moleküle des zellulären Chaperons **Cyclophilin A (CypA)** (Braaten et al., 1996; Thali et al., 1994; Franke et al., 1994), welches für die Infektiosität von HIV-1 der Gruppe M essentiell ist, in dem Viruspartikel enthalten.

A.2 Der Replikationszyklus von HIV-1

Bindung von HIV an zelluläre Rezeptoren: Infektion der Zielzelle

Die Bindung des HI-Virions an seine Zielzelle (z.B. T-Helfer-Lymphozyten, Monocyten/Makrophagen) wird durch die Wechselwirkungen der CD4-Bindungsregion des externen **gp120 Hüllproteins** mit dem **CD4-Rezeptormolekül** vermittelt (Kowalski et al., 1987; Olshevsky et al., 1990; Moebius et al., 1992; Ryu et al., 1994). Dieser spezifischen Bindung an den primären Rezeptor geht eine unspezifische Adhäsion des Viruspartikels an **Heparansulfat**, einem Bestandteil der Glykokalyx, voraus (Saphire et al., 1999; Cladera et al., 2001).

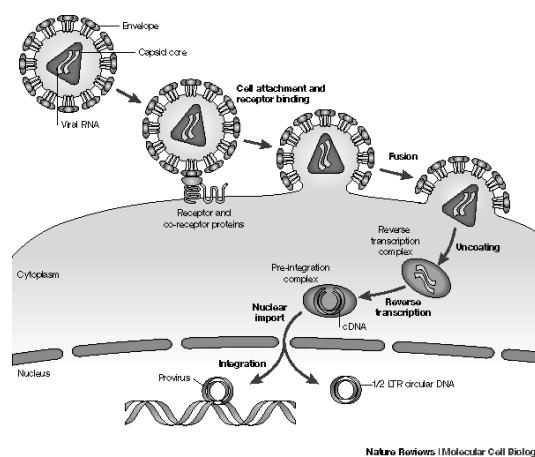


Abbildung A-2 Schematische Darstellung des frühen HI-viralen Replikationszyklus: ein infektiöses Virus bindet durch die Interaktion des viralen Hüllproteins gp120 mit den zellulären Rezeptor CD4 sowie den zellulären Ko-rezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 an die Zytoplasmamembran der Zielzelle. Nach Fusion der viralen Hüllmembran mit der Membran der Zielzelle, erfolgt die Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma. Bereits in dieser Phase wird die reverse Transkription des HI-viralen RNA Genoms initiiert. Anschließend wird das provirale DNA-Genom mittels des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern importiert und unspezifisch in das Genom der Wirtszelle integriert (modifiziert nach Moore und Stevenson, 2000)

Im Anschluß an die gp120-CD4 Interaktion finden strukturelle Umlagerungen innerhalb des Hüllglykoproteinkomplexes gp120/gp41 statt, wodurch bestimmte Regionen zwischen den V1/2 und V3 Regionen des externen Hüllproteins gp120 exponiert, und dessen Wechselwirkung mit

weiteren, zellulären **Ko-Rezeptoren** ermöglicht wird (Sattentau und Moore, 1991; Sattentau *et al.*, 1993; Thali *et al.*, 1993; Trkola *et al.*, 1996). In Abhängigkeit des Virustyps und des Infektionsstadiums dienen die Chemokinrezeptoren **CXCR4 (lymphotrope HI-Viren (X4))** bzw. **CCR5 (makrophagotrope HI-Viren (R5))** als Ko-Rezeptoren (zum Überblick: Horuk, 1999; Doranz *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Clapham und Weiss, 1997; Deng *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Die Interaktion mit dem Ko-Rezeptormolekül induziert eine weitere Konformationsänderung des gp120 Moleküls, die es nun dem **Transmembranprotein gp41** erlaubt, seine fusiogene Domäne von der Leucin-Zipper Region zu lösen und das hydrophobe, N-terminale Ende in die Plasmamembran der Zielzelle zu inserieren (Brasseur *et al.*, 1988; Sattenau und Moore, 1991; Wild *et al.*, 1994). Durch diesen Prozeß wird eine **pH-unabhängige Fusion** der Virusmembran mit der Zellmembran eingeleitet, wobei im Anschluß das Viruskapsid in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt wird (Stein *et al.*, 1987).

Auflösung des viralen Kapsids (*Disassembly*), nukleärer Import und Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom

Die Auflösung der konischen Kapsidstruktur („*uncoating*“) wird durch die aktivierte, virale Protease initiiert. Ferner wird durch die Änderung des Ionen- und pH-Milieus im Zytoplasma die Synthese der viralen cDNA (**Reverse Transkription**), die durch die virale Reverse Transkriptase RT (p66) katalysiert wird, eingeleitet (zur Übersicht: Prasad und Goff, 1990; Whitcomb und Hughes, 1992; Katz und Skalka, 1994; Gotte *et al.*, 1999). Nachdem die virale DNA vollständig synthetisiert wurde, wird diese als Bestandteil des **Prä-Integrationskomplexes** (PIC; „*pre-integration complex*“) aktiv aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert. Dieser Komplex setzt sich –soweit bislang bekannt ist– aus den viralen Proteinen IN, RT, p17^{MA} und Vpr (Farnet und Haseltine, 1991; Bukrinsky *et al.*, 1993; Lee und Craigie, 1994; Heinzinger *et al.*, 1994; Bushman und Miller, 1997), sowie weiteren zellulären Wirtsproteinen, wie z.B. HMG-I(Y) (Farnet und Bushman, 1997; Miller *et al.*, 1997) und VAN (Gupta *et al.*, 2000) zusammen. Der Import wird vermutlich durch das akzessorische Protein Vpr vermittelt (Fouchier *et al.*, 1998 und 1999; Nie *et al.*, 1998; Popov *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998; Freed *et al.*, 1993). Nach erfolgter unspezifischer **Integration** der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle, katalysiert durch die virale Integrase IN (p32) (Fujiwara *et al.*, 1988; Vink *et al.*, 1993), wird die Expression der viralen Gene initiiert.

Regulation der viralen Genexpression

Das etwa 9600-9700bp lange, provirale HIV Genom wird beidseitig von **LTR-Regionen** („*long terminal repeat*“) flankiert. Das LTR wird unterteilt in die Regionen U3, R und U5, und enthält im wesentlichen strukturelle Elemente, die für die virale Transkriptionsinitiation (Promotor/Enhancer) und Termination (Polyadenylierungssignal) essentiell sind (Bohnelein *et al.*, 1989; Cullen, 1991; Brown *et al.*, 1991). In der 5'-LTR Region befinden sich zum Beispiel Bindestellen für die zellulären Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT-1 und Ets-1 sowie NF- κ B und SP1. Obwohl die anfängliche Transkription, ausgehend vom **5'-LTR Promotor** sehr ineffizient ist, werden trotzdem geringe Mengen mehrfach gespleißter mRNA Transkripte aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma translatiert. Ein Genprodukt dieser RNA-Spezies ist das regulatorische 14kDa Protein **Tat** (Rice *et al.*, 1988). Dieses essentielle, nukleäre Aktivatorprotein der viralen Transkription bindet an eine ebenfalls im 5'-LTR gelegene, transkribierte RNA-Haarnadelschleife **TAR** („*transactivating response element*“) (Berkhout *et al.*, 1990; Gatignol *et al.*, 1991; Dingwall *et al.*, 1989; Weeks *et al.*, 1990; Weeks und Crothers, 1991; Puglisi *et al.*, 1992;

Churcher *et al.*, 1993, West und Karn, 1999) und rekrutiert weitere zelluläre Faktoren, wie z.B. den Komplex Cyclin T1/CDK9 (Wei *et al.*, 1998; Hermann *et al.*, 1998; Isel und Karn, 1999). Eine durch CDK9 vermittelte Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II erhöht infolgedessen die Prozessivität des Transkriptionskomplexes und gewährleistet somit eine effiziente Elongation der viralen Transkription (zur Übersicht: Karn, 1999).

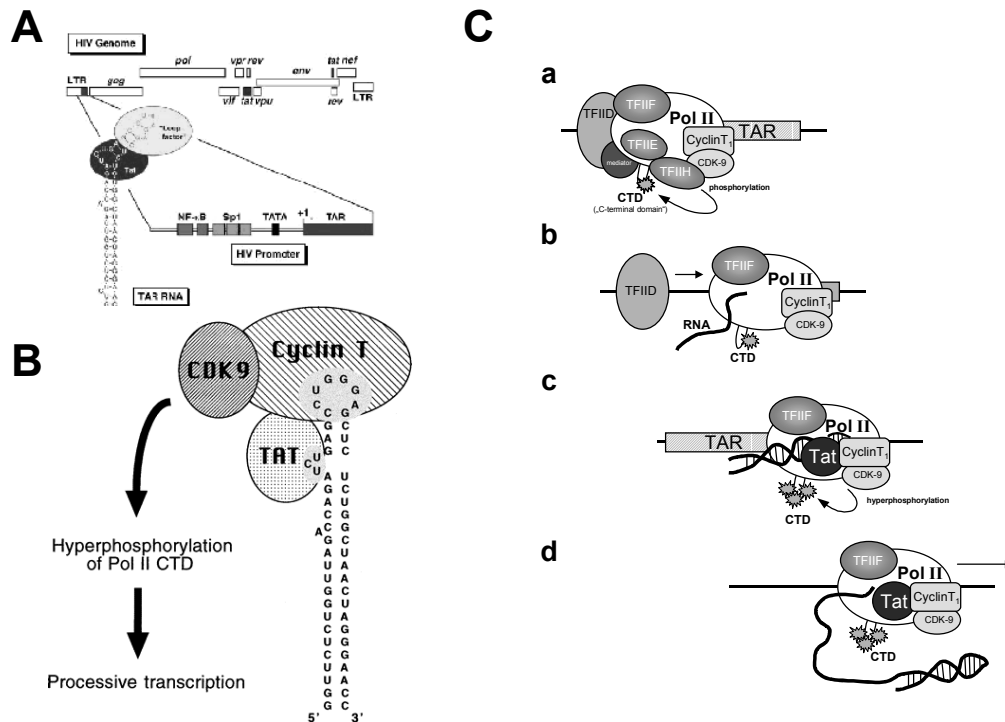


Abbildung A-3 Regulation der HI-viralen Transkription. **(A)** Die RNA-Harnadelschleife TAR wird unmittelbar nach der Initiation der Transkription am HI-viralem LTR Promotor transkribiert. **(B)** An diese RNA-Struktur bindet sowohl das virale, regulatorische 14kDa Protein Tat, als auch andere zelluläre Faktoren, wie z.B. der Komplex CyclinT1/CDK9. **(C)** Der Mechanismus der Aktivierung der LTR-abhängigen Transkription: nach Ausbildung des initialen Transkriptionskomplexes **(a)** erfolgt die Initiation der Transkription durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II durch den Transkriptionsfaktor TFIIF. **(b)** Sobald die TAR Region transkribiert und sich die Haarnadelschleife ausgebildet hat, **(c)** verlangsamt sich die Transkription und es kommt zur Ausbildung des trimeren, an TAR gebundenen Komplexes Tat/CyclinT1/CDK9 (TAK). **(d)** Die anschließende Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II ermöglicht unter Freisetzung der TAR-Schleife, die Elongation der Transkription. (modifiziert nach Karn, 1999)

Die zeitliche Expression viraler Genprodukte unterliegt einer komplexen post-transkriptionellen Regulation (zur Übersicht: Malim und Cullen, 1991). In der **frühen Phase** der Transkription werden die zunächst ungespleißten prä-mRNAs aufgrund der ineffizienten und z.T. kryptischen Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen (Purcell und Martin, 1993; O'Reilly *et al.*, 1995; Dyhr-Mikkelsen und Kjems, 1995) im Zellkern zurückgehalten, wo sie desweiteren gespleißt und exportiert oder aber degradiert werden.

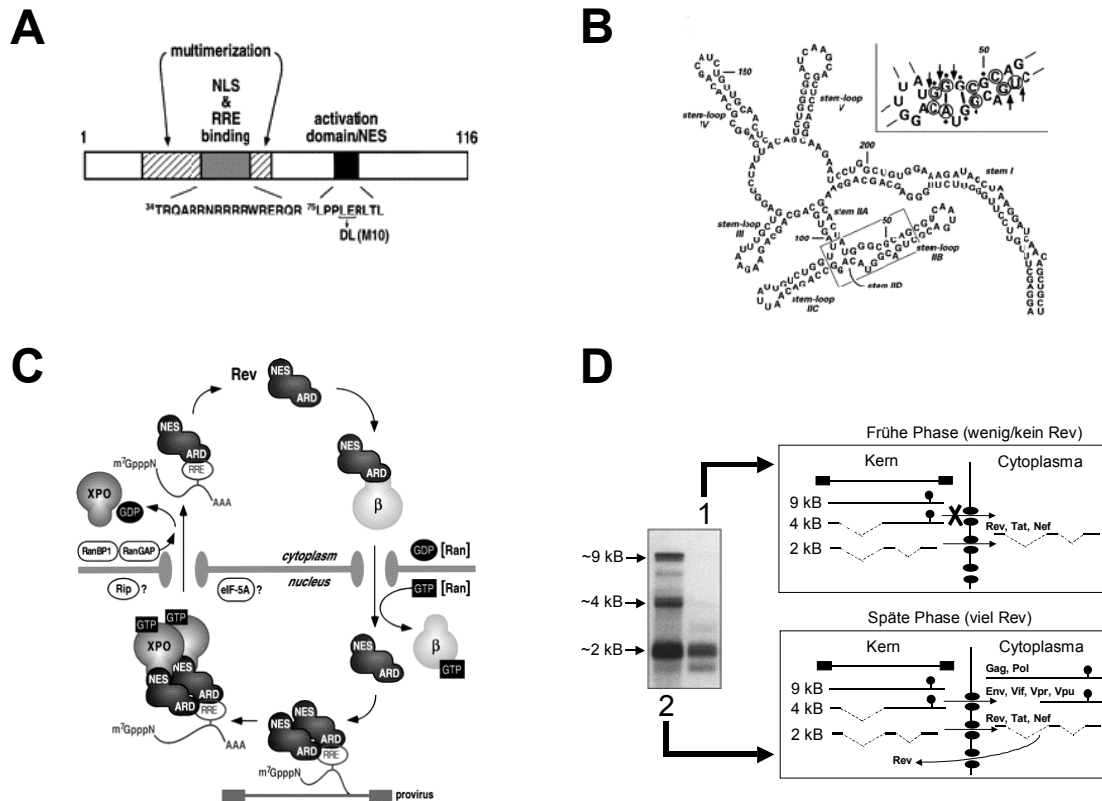


Abbildung A-4 Post-transkriptionelle Regulation der HI-viralen Genexpression. **(A)** Schematische Darstellung funktioneller Domänen des viralen Proteins Rev, welches **(B)** an eine charakteristische RNA Sekundärstruktur (RRE), die innerhalb der env kodierenden Region lokalisiert ist, bindet und dort oligomerisiert. **(C)** Mechanismus des Rev-vermittelten Exports viraler pre-mRNA: nach Bindung und Oligomerisierung der Rev Moleküle an RRE bindet der zelluläre Exportfaktor CRM1/Exportin 1 zusammen mit RanGTP an das Kernexportsignal (NES) von Rev. Der RRE/Rev/CRM1/RanGTP-Komplex wird anschließend aktiv unter Hydrolyse von GTP zu GDP durch die Kernpore in das Zytoplasma exportiert. Nach Auflösung des Export-Komplexes und Freisetzung der viralen RNA wird das „Shuttle“-Protein Rev, welches eine Kernimportsequenz (NLS) besitzt, von Importin- β gebunden und wieder in den Zellkern transportiert. **(D)** Expressionskinetik **(1)** früher und **(2)** später HI-viraler Proteine: die nukleäre Konzentration des viralen Regulatorproteins Rev reguliert den Export vollständig gespleißter (frühe Phase) und partiell bzw. ungespleißter Transkripte (späte Phase) aus dem Zellkern. (modifiziert nach Pollard und Malim, 1998).

Die **nukleäre Degradation ungespleißter, viraler RNA-Transkripte** wird auf bislang noch unbekannte Weise durch A/U-reiche Sequenzen oder Sequenzmotive (**INS**; „*inhibitory sequences*“) vermittelt (Rosen *et al.*, 1988; Chochrane *et al.*, 1991; Maldarelli *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1997; Malim und Cullen, 1993). Durch diesen Regulationsmechanismus werden zunächst ausschließlich mehrfach gespleißte RNA-Transkripte (~2kb) aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Diese kodieren unter anderem für das virale 13kDa Regulatorprotein **Rev**. Das nukleäre, Phosphoprotein Rev bindet in oligomerer Form an eine ausgeprägte **RNA-Sekundärstruktur RRE** („*Rev-responsive element*“), die innerhalb der für die viralen Hüllproteine kodierenden Region *env* liegt und in allen einfach- und ungespleißten HIV RNA Transkripten vorhanden ist (Rosen *et al.*, 1988; Dayton *et al.*, 1992; Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1989; Daly *et al.*, 1989; Kjems *et al.*, 1991; Charpentier *et al.*, 1997; Iwai *et al.*, 1992; Mann *et al.*, 1994; Battiste *et al.*, 1994 und 1996, Tiley *et al.*, 1992). Rev blockiert zudem die Zusammenlagerung des Spleißapparates am **Spleißdonor (SD1)** und wirkt somit weiteren Spleißprozessen entgegen (Chang und Sharp, 1989; Kjems *et al.*, 1991; Kjems und Sharp 1993; Konforti *et al.*, 1993, Tango *et al.*, 1996). Des weiteren interagiert Rev mittels der C-terminalen Domäne **NES** (*nuclear export signal*) mit dem zellulären Kernexportfaktor **CRM1/Exportin1** und vermittelt dadurch den Export der einfach gespleißten (~4kb) und ungespleißten (~9kb) viralen

Transkripte aus dem Zellkern (zur Übersicht: Cullen, 1998 und Hope, 1999; Wolff *et al.*, 1997). Durch die weitere Interaktionen mit **Ran-GTP** und Assoziation mit Proteinen des Kernporenkomplexes, wie z.B. Nup214 und Nup98 (Fornerod *et al.*, 1997; Farjot *et al.*, 1999, Askjaer *et al.*, 1998), wird der Komplex durch die Hydrolyse von GTP in GDP aktiv durch die Kernpore in das Zytoplasma transloziert (zur Übersicht: Nilsson *et al.*, 2001). Im Zytoplasma erfolgt die Dissoziation des Komplexes unter Freisetzung der viralen mRNA, wobei Rev aufgrund einer aminoterminalen Kernlokalisierungssequenz (**NLS**; *nuclear localization signal*) wiederum in den Zellkern transportiert wird (Hope *et al.*, 1990, Berger *et al.*, 1991, Hammerschmid *et al.*, 1994). Auf diese Weise wirkt das „Shuttle“-Protein Rev als Schalter der frühen Synthese mehrfach gespleißter mRNAs (Tat, Rev, Nef) und der späteren Synthese von einfach gespleißten (Env, Vpu, Vif, Vpr) und ungespleißten mRNA-Transkripte (Gag, Gag-Pol).

Expression HI-viraler Strukturproteine: Zusammenbau unreifer Virionen an der Plasmamembran (*Assembly*)

Die inneren Strukturproteine von HIV werden von dem Gen *gag* („*group specific antigen*“) kodiert (zur Übersicht: Wills und Craven, 1991; Henderson *et al.*, 1992; Freed *et al.*, 1999). Dieses wird als **55kDa-Vorläuferprotein (Pr55^{gag})** an freien, sich im Zytoplasma befindlichen Ribosomen von einer ungespleißten, ~9kb umfassenden mRNA in der späten Phase der viralen Replikation translatiert. Unter Abspaltung des N-terminalen Methioninrestes (Met₁) wird ko-translational ein **Myristylsäurerest** mit dem zweiten Gylzinrest des Gag Proteins (Gly₂) kovalent verknüpft. Diese Reaktion wird von der zellulären Myristyl-CoA-Acetyl Transferase katalysiert (Gheysen *et al.*, 1989; Göttlinger *et al.*, 1989; Bryant und Ratner, 1990, Pal *et al.*, 1990; Freed *et al.*, 1994). Der durch Motorproteine vermittelte Transport des Vorläuferproteins entlang der Mikrotubuli an die **Plasmamembran** wird durch eine aminoterminal Signalsequenz innerhalb des Matrixproteins p17^{MA} (As 84-88) vermittelt (Facke *et al.*, 1993; Gallina *et al.*, 1994; Reil *et al.*, 1998, Freed *et al.*, 1994). Anschließend werden die viralen Vorläuferproteine mittels den Myristyl-Ankern kovalent in der Lipid-Doppelschicht verankert, wobei die Membranassoziation durch eine Ansammlung basischer und hydrophober Aminosäurereste innerhalb des N-terminalen Anteils der p17^{MA} Region (**M-Domäne**) gewährleistet wird (Yuan *et al.*, 1993; Massiah *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1996; Zhou und Resh, 1996). In etwa 5-10% aller Translationsereignisse ereignet sich ein **ribosomaler –1 Leserastersprung** („*ribosomal frame shift*“) nahe dem 3'-Ende des Gag kodierenden Bereichs (Jacks *et al.*, 1988). Für diesen Leserastersprung, welcher die Voraussetzung für die Translation eines 160kDa **Gag-Pol Vorläuferproteins (Pr160^{gagpol})** ist, sind zwei in cis wirkende Signale auf der viralen mRNA verantwortlich. Durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife im p1-Bereich verlangsamt sich zum einen die Proteinbiosynthese und an einer in 5'-Richtung liegenden Hepta-Nukleotidsequenz UUUUUUA („*slippery sequence*“) erfolgt schließlich der Leserastersprung. Der *pol* Leserahmen kodiert für die viralen Enzymfunktionen. Ebenso wie Pr55^{gag} wird auch das Pr160^{gagpol} Vorläuferprotein an die Plasmamembran transportiert und mit dieser über einen Myristyl-Anker kovalent verknüpft. Im Verlauf der Expression viraler Strukturproteine kommt es unterhalb der Plasmamembran zu einer geordneten Akkumulation von ungefähr 1500 bis 2000 Kopien des Gag Polyproteins und 70 bis 100 Kopien des Gag-Pol Vorläuferproteins. Die Aggregation der Strukturproteine wird u.a. durch intermolekulare Oligomerisierungsdomänen innerhalb des p24-Kapsidproteins (As 153-172; As 173-231) und des p7-Nukleokapsidproteins (**I-Domäne**) gewährleistet (Zhang *et al.* 1996; Jowett *et al.*, 1992).

Die Hüllproteine **gp120/gp41** werden von dem Gen *env* als gp160^{env}-Polyprotein von den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Nach Ausbildung stabiler

oligomerer Komplexe, werden diese im Golgi Komplex glykosyliert, durch zelluläre Proteasen in gp41 und gp120 gespalten (Decroly *et al.*, 1997; Hallenberger *et al.*, 1997) und anschließend in Form von Trimeren auf die Oberfläche der Plasmamembran transportiert. Der Einbau der Hüllproteine erfolgt über spezifische Wechselwirkungen der C-terminalen Domäne von gp41 mit der Matrixdomäne der Gag bzw. GagPol Vorläuferproteine (Freed *et al.*, 1995 und 1996; Cosson P, 1996; Vincent *et al.*, 1999; Wyma *et al.*, 2000). Somit bestimmen die bereits in der Plasmamembran vorhandenen gp41-Moleküle durch Interaktion mit Bereichen innerhalb der Matrixproteine, die Stellen, an der die Gag bzw. GagPol Vorläuferproteine unterhalb der Zellmembran zu elektronendichten Strukturen kondensieren.

Die Verpackung des viralen Genoms erfolgt durch die Bindung der proximalen der beiden Nukleinsäure-bindenden Zinkfinger-Motive des p7^{NC} mit einem definiertem Bereich der viralen RNA. Diese **ψ -Sequenz** befindet sich z.T. im 5'-nicht translatierten Bereich (UTR, „*untranslated region*“) und überlappt ebenfalls partiell den Gag kodierenden Bereich (Sakaguchi *et al.*, 1993). Als weitere RNA Moleküle werden spezifisch zelluläre t_{Lys}-RNAs über eine RT-Domäne im Gag-Pol Vorläuferprotein und unter Beteiligung der Nukleokapsidproteine in das Virion verpackt (Barat *et al.*, 1993; Richter-Cook, *et al.*, 1992).

Knospung und Reifung der Virionen zu infektiösen HIV-Partikel

Unter Ausbildung sphärischer Strukturen unterhalb der Plasmamembran erfolgt die Knospung und Abschnürung unreifer HI-Virionen, wobei der genaue Mechanismus der Partikelknospung für die C-Typ Retroviren noch unklar ist. Unter anderem werden als treibende Kraft der Membranausstülpung die Einführung von Gag-Pentameren in das ursprünglich hexagonale, submembrane Gag-Gitter und die Beteiligung des zellulären Aktin-Gerüsts diskutiert (Nermut *et al.*, 1994 und 1998; Barklis *et al.*, 1998 Arthur *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1999). Das p6^L Protein spielt -wie auch das akzessorische Protein Vpu- bei der Freisetzung der Virionen eine große Rolle. Zudem vermittelt p6^L durch Interaktion mit dem Vpr-Protein dessen Einbau in den Viruspartikel.

Während oder kurz nach der Freisetzung unreifer Virionen von der Plasmamembran erfolgt die autokatalytische Freisetzung der **viralen Protease**. Anschließend werden durch Spaltung der Gag-bzw. Gag-Pol-Vorläuferproteine mit Hilfe der aktiven, dimeren Form der viralen Protease (PR) die Strukturproteine Matrixprotein (p17^{MA}), Kapsidantigen (p24^{KA}), Nukleokapsidprotein (p7^{NC}) und Linkprotein (p6^L), sowie die viralen Enzyme Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) freigesetzt. Die Funktion der Spaltprodukte p1 und p2 ist bislang unbekannt. Die Regulation der proteolytischen Aktivität erfolgt vermutlich durch von äußeren Faktoren abhängige kompetitive Inhibition der HI-viralen Protease durch virale Peptide (p2; p6*) (Pettit *et al.*, 1998; Tessmer und Kräusslich, 1998; Partin *et al.*, 1991; Zybarth *et al.*, 1994; Paulus *et al.*, 1999).

Während bei der Partikelreifung die Matrixproteine mit der Innenseite der Plasmamembran assoziiert bleiben, kondensieren sich die abgespaltenen p24 Kapsidproteine durch konformationelle Neuorientierung zu einer konisch geformten Hülle, die den **elektronendichten Ribonukleoproteinkomplex (RNP)**, bestehend aus zwei Molekülen der viralen RNA, tLys-RNA, dem p7^{NC} sowie den viralen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN), einschließt. Der korrekte Einbau und die Prozessierung der viralen Proteine während des Reifungsprozesses zu viralen Partikel von entsprechender Dichte sind essentielle Voraussetzungen für die Infektiösität von HIV.

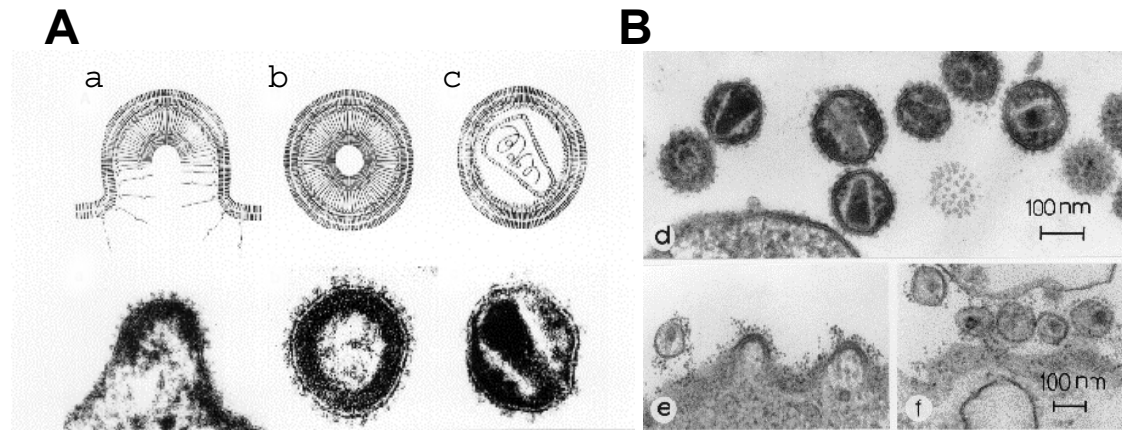


Abbildung A-5 Knospung und Reifung infektiöser HI-Viren. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit entsprechender schematischer Darstellung der (a) streng geordneten Zusammenlagerung der Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} Polyproteine und (b) die dadurch bedingte Abschnürung unreifer HI-Virionen von der Zytoplasmamembran, sowie (c) die Anordnung der prozessierten Proteine in dem reifen, infektiösen Viruspartikel. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen (d) freier Viruspartikel in unterschiedlichen Reifungsstadien, (e) sich abschnürende virale Partikel sowie (f) freie, unreife Virionen zu sehen (modifiziert nach Gelderblom et al., 1989)

A.3 Klinik und Pathogenese der HIV-1 Infektion: Viruselimination durch antivirale Therapie ?

Die **akute HIV-Erkrankung** kann sich, in Abhängigkeit viraler Faktoren sowie Wirtsfaktoren, nach einer Inkubationszeit von ca. 1-3 Wochen durch plötzlich auftretende grippeähnliche, unspezifische Symptome äußern. Während der bis zu 10 Jahren andauernden **symptomfreien Phase**, wird die Virusvermehrung zum größten Teil erfolgreich supprimiert. HIV-spezifische, zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten (ZTL, „cytotoxic T lymphocytes“) spielen dabei eine entscheidende Rolle (Koup et al. 1994, Borrow et al. 1994). Diese hemmen die Ausbreitung des Virus im Organismus durch gezielte Abtötung HIV-infizierter Zellen. Die Bedeutung der ZTLs zeigt sich vor allen Dingen bei den HIV-Langzeitüberlebenden (LTNP; „long-term non progressors“), die im Gegensatz zu Patienten mit raschem Krankheitsverlauf eine hohe Anzahl HIV-spezifischer Vorläufer-ZTLs mit breiter Spezifität gegen verschiedene Virusproteine, besitzen (Harrer et al., 1994 und 1996; Hogervorst et al., 1995; Clerici und Shearer 1996; Barker et al., 1997 und 1998; Pilgrim et al., 1997; Betts et al., 1999; Wagner et al., 1999). Als Ergebnis des Zusammenspiels von viralen und Wirtsfaktoren bildet sich des weiteren ein je nach Individuum unterschiedliches Niveau der Virusaktivität im **Gleichgewicht** der HIV Replikation und der Zerstörung infizierter Zellen durch die ZTL-Reaktivität aus. Im weiteren Verlauf kommt es allerdings zu einem fortschreitenden Verlust von CD4⁺-Helfer T-Lymphozyten. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen HIV Replikation und Viruseliminierung durch das Immunsystems erheblich gestört und es kommt infolgedessen zu einer **zellulären Immundefizienz**. Diese ist geprägt durch ein gesteigertes Risiko für opportunistische Infektionen, wie z.B. Pneumonie (z.B. *Pneumocystis carinii*), zerebrale Toxoplasmose, CMV-Retinitis, Mykobakteriose, Soor-Ösophagitis oder Kaposi-Sarkom (KS). Bei Auftreten der ersten opportunistischen Infektionserkrankungen spricht man von der **klinisch-symptomatischen HIV-Infektion**, die in den darauffolgenden Jahren unbehandelt unweigerlich zum **Tod** des Patienten führt.

Die Zeitspanne zwischen einer initialen HIV Infektion und dem Tod des Patienten infolge der AIDS Erkrankung ist sehr variabel. In den vergangenen Jahren wurde diese Zeitspanne allerdings durch die Entwicklung einer Vielzahl von **antiretroviralen Medikamenten**, wie z.B. Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase (z.B. AZT, 3TC, Nevirapin, etc.) und Protease (z.B. Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, etc.), deutlich verlängert. Bevor diese Kombinationstherapien zur Behandlung der HIV-Infektion zur Verfügung standen, erkrankten etwa 50% der infizierten Patienten innerhalb der ersten 10 Jahre ihrer HIV-Infektion. Obwohl die Selektion Therapie-resistenter Virusmutanten, begünstigt durch die hohe Fehlerrate der viralen Reversen Transkriptase, durch ein **hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)**; „*highly active anti-retroviral therapy*“), bei der mindestens drei bzw. vier verschiedene Medikamente verabreicht werden, unterdrückt werden kann, stellt das Auftreten **resistenter Viren** infolge des Selektionsdrucks und die **schlechte Verträglichkeit** der Präparate langfristig gesehen ein großes Problem dar. Letztendlich wird durch gängige Therapeutika lediglich die virale Replikation supprimiert, das Virus selbst allerdings nicht vollständig eliminiert. Vermutlich durch den Verlust einer kontinuierlichen Immunstimulation durch die virale Replikation, konnte in vielen Patienten nach Absetzen der Therapie eine stark erhöhte Viruslast nachgewiesen werden (Chun *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 1999). Insbesondere frühzeitig initiierte antivirale HAART-Therapien begünstigen diesen Effekt. Allerdings wurde auch beschrieben, daß durch wiederholte, **kontrollierte Unterbrechungen** der Therapie, die zelluläre Immunabwehr wieder in der Lage war, die virale Replikation auch ohne fortwährende Behandlung über einen bestimmten Zeitraum hinweg zu kontrollieren (Robenberg *et al.*, 2000). Eine weitere Problematik besteht darin, daß HIV in der Lage ist, „latent“ in bestimmten **zellulären Reservoirs**, wie z.B. dem lymphatischen Gewebe und den follikulär dendritischen Zellen (Pantaleo *et al.*, 1991; Fox *et al.* 1991; Laurence 1993, Pantaleo und Fauci 1995) zu überdauern, so daß eine vollständige Eliminierung des Virus durch antivirale Therapien nahezu unmöglich erscheint.

Aufgrund der dargestellten Problematik antiretroviraler Therapien ist die Entwicklung wirksamer und kostengünstiger Impfstoffe, die sowohl prophylaktisch vor HIV-Infektionen schützen (**präventive Vakzinierung**), als auch zur Unterstützung natürlicher anti-viraler Immunreaktionen Therapie begleitend angewandt werden können (**therapeutische Vakzinierung**), von größter Wichtigkeit.

A.4 Die Entwicklung eines HIV-spezifischen Impfstoffes

Anforderungen an einen HIV-spezifischen Impfstoff

Die Anforderungen an einen wirksamen HIV-Impfstoff ergeben sich, neben allgemeinen Aspekten der Sicherheit, Effektivität und Wirtschaftlichkeit, aus den Besonderheiten des viralen Infektionszyklus und den Pathogenitätsmechanismen. Da das Virus primär durch Sexualkontakte übertragen wird, steht die Induktion einer starken **mukosalen Immunantwort** im Vordergrund. Sekretorische HIV-spezifische IgA Antikörper (S-IgA) könnten dabei eine Primärinfektion durch Inhibition des Transports des Virus durch die Mukosa direkt an der Eintrittspforte verhindern (McGhee und Kiyono, 1993; Staats *et al.*, 1994; Milman und Sharma 1994; Hocini *et al.*, 1997; Mazzoli *et al.*, 1997; Bomsel *et al.*, 1998; Kaul und Ogra *et al.*, 1998, Clerici *et al.*, 1999). Des weiteren sollte eine geeignete HIV-Vakzine **neutralisierende Antikörper** mit einem breiten Reaktionsspektrum gegen primäre Virusisolate induzieren, um so die Infektion neuer Wirtszellen zu inhibieren (Allan *et al.*, 1985; Robey *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1996; Morre und Burton,

1999; Montefiori und Moore, 1999;). Auch die Induktion einer effizienten zellulären Immunantwort und die Bildung **zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen** zur Kontrolle der Virämie, Elimination virusinfizierter Zellen (Walker *et al.*, 1987 und 1990; Plata *et al.*, 1987 und 1992; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994) und Induktion **immunmodulatorischer Mediatoren** der Antigen-unabhängigen, unspezifischen Immunantwort (Cocchi *et al.*, 1995; Alkhatib *et al.*, 1996; Mackewicz *et al.*, 1994, 1995 und 1996; Levy *et al.*, 1996) ist für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes von großer Bedeutung. Aus diesem Grund sollte eine HIV-Vakzine nicht nur eine humorale, sondern auch eine effiziente zelluläre Immunantwort, sowie die Bildung langlebiger Gedächtniszellen induzieren können. Die Entwicklung eines übergreifenden und insbesondere eines neutralisierenden Antikörper induzierenden HIV-Impfstoffes ist allerdings aufgrund der hohen Vielfalt, genetisch unterschiedlicher viraler Subtypen und rekombinanter Viren schwierig. Zudem konnte bislang keine eindeutige Korrelation zwischen neutralisierenden Serotypen und genetischen Subtypen dokumentiert werden (Kostrikis *et al.* 1996, Moore *et al.*, 1996).

HIV-Impfstoff Kandidaten und Immunisierungsstrategien

Weltweit wurden bislang mehr als 60 klinische Studien der **Phase I/II** durchgeführt, in denen im wesentlichen die Verträglichkeit und Immunogenität der HIV-Impfstoffkandidaten an ausgewählten Personengruppen getestet wurde. Lediglich eine auf rekombinantem Hüllprotein (rgp120) basierende Spaltvakzine wurde bislang zur wichtigsten klinische Studie der **Phase III** zugelassen. Diese umfaßt die partielle Vakzinierung und immunologische Analyse von Personengruppen in Gebieten mit hoher HIV-Prävalenz und liefert somit wertvolle Informationen über die durch den Impfstoff induzierte Immunität. In der Zwischenzeit allerdings wurde aus zahlreichen weiteren klinischen Studien mit HIV-Infizierten und aus Versuchen mit verschiedenen Primaten-Tiermodellen deutlich, daß vermutlich nur eine kombinatorische Verabreichung unterschiedlicher HIV-Vakzine Kandidaten (**kombinatorische Vakzine**) zur Induktion einer ausreichenden und umfassenden Immunität führen kann (Fleury *et al.*, 1996; Belshe *et al.*, 1998 und 2001, Salmon-Ceron *et al.*, 1999, Amara *et al.*, 2001). Moderne Konzepte zur Entwicklung eines geeigneten HIV-Impfstoffes sehen aus diesen Gründen die Kombination unterschiedlicher Impfstoffe (z.B. Protein, Peptid, DNA, etc.) gegen unterschiedliche virale Antigene (Hüll,- und Strukturproteine, regulatorische sowie akzessorische Proteine) verschiedenster Virusisolaten (Subtyp A, B, C, E, F, D), als auch verschiedenste Immunisierungsrouten und Applikationsformen vor. Eine Vielzahl dieser Konzepte wird gegenwärtig in klinische Studien der Phase I/II getestet und für einige dieser neuartigen Impfstoffe sind bereits klinische Studien der Phase III initiiert oder zumindest geplant worden (zur Übersicht: <http://hiv-web.lanl.gov/>). Aber auch in den kommenden Jahren wird die Entwicklung eines breiten Spektrums an potentiellen HIV-Impfstoffen von großer Bedeutung sein. Im Folgenden werden einige der vielversprechendsten Vakzinekandidaten, die gegenwärtig in verschiedenen klinischen Studien evaluiert werden, erläutert. Die **Peptid-Vakzine** basiert auf der Immunisierung von bereits identifizierten und chemisch synthetisierten, zumeist immundominanten B- und T-Zell Epitopen zur Induktion einer spezifischen Immunreaktion (zur Übersicht: Berzofsky, 1995). Allerdings besitzen diese auch in Gegenwart von immunstimulierenden Adjuvantien, wie z.B. Al(OH)₃, nur eine geringe Immunogenität und ihre Anwendung ist aufgrund weiterer Faktoren stark limitiert. So sind die meisten linearen Peptide nicht in der Lage, neutralisierende Antikörper gegen primäre Virusisolate zu induzieren, welche in den meisten Fällen gegen konformationelle Strukturen des Hüllproteins gerichtet sind (Ghiara *et al.*, 1997, Gorse *et al.*, 1996, Rubinstein *et al.*, 1994). Die Effektivität von Peptiden, die konformationelle Strukturen besitzen („Mimotope“), ist bislang noch nicht ausreichend dokumentiert. Dem gegenüber konnte die 2. Generation der Peptide-Vakzine, die

eine Vielzahl von ZTL und T-Helfer Epitope enthalten (Polypeptiden), in einigen Fällen eine effektive Immunantwort induzieren (Berzofsky *et al.*, 1991, Bartelett *et al.*, 1998, Ahlers *et al.*, 1993 und 1997). Eine Verbesserung der peripheren als auch mukosalen Immunogenität konnte durch Kopplung der Peptide an bestimmte „Trägerstoffe“, wie z.B. komplexe Proteine (z.B. Tetanus Toxoid, HbsAg, etc.) und Lipide sowie durch Ko-Verabreichung starker Adjuvantien oder immunmodulatorischer Moleküle, wie z.B. IL-12 erzielt werden (Greenstein *et al.*, 1992; Rubinstein 1995 und 1999, Kahn *et al.*, 1992; Belyakov *et al.*, 1998, Oscherwitz *et al.*, 1999). Die Möglichkeit einer gezielten und kontrollierten Immuninduktion rechtfertigt in diesem Fall die Weiterentwicklung und Verbesserung dieses Impfstoffkonzepts. Eine Vielzahl prä-klinischer Immunisierungstudien im Tiermodell und klinischen Studien der Phase I/II zeigten, daß eine Vakzinierung mit aus Insektenzellen (Dolin *et al.*, 1991), Hefezellen (Keefer *et al.*, 1996) oder idealerweise aus eukaryontischen CHO Zellen („*Chinese Hamster Ovary*“) (Pincus *et al.*, 1997) aufgereinigten rekombinanten, viralen Hüllprotein-Monomeren gp120 (SU) und gp160^{env} (**Spaltvakzine**) zwar in der Lage ist neutralisierende Antikörper gegen die Laborisolate, auf deren Basis die Impfstoffe entwickelt worden waren, nicht aber gegen primäre Virusisolate zu induzieren (Mascola, *et al.*, 1996; Gorse *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1998; VanCott *et al.*, 1995, Keefer *et al.*, 1994 und 1997). Interessanterweise wurden durch die Verabreichung von gp120 insgesamt weniger, jedoch mehr neutralisierende Antikörper induziert als nach Vakzinierung mit gp160 (Belshe *et al.*, 1993 und 1994; Graham *et al.*, 1996). Zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen Primärisolate wird in den gegenwärtigen klinischen Studien der Phase II/III diejenige Spaltvakzine verwendet, die sich von dem in der jeweiligen Region vorkommendem viralem Subtyp ableitet, wie z.B. Subtyps C/E in China, Subtyp A in Afrika oder Subtyp B in Europa (<http://www.vaxgene.com>). Obwohl in einigen Fällen reaktive T Zellen detektiert werden konnten, wurden trotz Ko-Verabreichung immunstimulatorischer Adjuvantien, wie z.B. MF59 (O'Hagen, *et al.*, 2000), keine spezifischen, reaktiven CD8⁺ T-Zellen induziert (Graham *et al.* 1996, Stanhope *et al.* 1993). Die Vakzinierung mit **attenuierten Lebendimpfstoffen** (zur Übersicht: Haga *et al.*, 1998; Johnson und Desrosiers, 1998, Ruprecht, 1999; Kestler und Jeang, 1995, Victorino und Sousa, 1995), wie z.B. mit Nef- oder Vpr-Deletionsmutanten, induzierte in prä-klinischen Studien effektive und langanhaltende humorale und zelluläre Immunantworten. Allerdings zeichnete sich schnell ab, daß aufgrund hoher spontaner, als auch durch Rekombination mit Wildtyp HI-Viren entstandener Rückmutationen zu hoch infektiösen Viren, diese Art der Vakzine aus Sicherheitsgründen keine Anwendung im Menschen finden wird (Daniel *et al.*, 1992; Cranage *et al.*, 1997; Wyand *et al.*, 1996; Baba *et al.*, 1995 und 1996; Stahl-Hennig *et al.*, 1996). Ähnliche Sicherheitsbedenken gelten auch für chemisch inaktivierte HI-Viren (**Totimpfstoff**), die zudem eine sehr geringe Immunogenität gegen das virale Hüllprotein gp120 aufwiesen, welches aufgrund des Aufreinigungsverfahrens der Partikeln meist verloren geht (Gibbs *et al.*, 1991; Niedrig *et al.*, 1993; Trauger *et al.*, 1995, Sheets und Goldenthal, 1998). Die Knospung und Freisetzung partikulärer, mit einer zellulären Lipidmembran umhüllter **Virus-ähnlicher Partikel (VLPs)** wird bereits allein durch das virale Pr55^{gag} Polyprotein induziert (Haffar *et al.*, 1990; Nermut *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994 und 1998, Brand *et al.*, 1995). Durch rekombinante oder gentechnische Methoden können problemlos, noch zusätzliche virale Genfragmente eingebaut werden, deren antigene Fragmente dann in die VLPs integriert und als Vakzine verabreicht werden können (Haffar *et al.*, 1991; Rovinski *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1992; Deml *et al.*, 1997, Wagner *et al.*, 1996, 1998 und 1999; Kang *et al.*, 1999). Während sich die aus Insektenzellen aufgereinigten VLP-Varianten im Mausmodell als hochimmunogen erwiesen, konnte durch die Verabreichung von Pr55^{gag}-VLPs, in welchen zusätzlich das HI-virale Hüllprotein gp160 integriert war, keine sterile Immunität im Makakenmodell induziert werden (Notka *et al.* 1998). Eine initiale klinische Phase I Studie mit aus Hefe aufgereinigten Ty p17/p24 VLPs war im

Gegensatz zu den vorausgegangenen Studien im Mausmodell System, aufgrund einer nur ineffizient induzierten humoralen und zellulären Immunantwort, ebenso wenig erfolgreich (Layton *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1994; Martin *et al.* 1993, Veenstra *et al.*, 1996). Ein weiteres, neuartiges Immunisierungskonzept ist die Insertion viraler Gene in apathogene oder attenuierte, **virale oder bakterielle Vektoren**, die sich als zumeist effektiver als die Immunisierung mit nackter Plasmid-DNA (**DNA-Vakzine**) erwies. Nach Infektion der Zielzelle, werden die Fremdgene *in vivo* exprimiert und induzierten, wie bereits in mehreren Studien gezeigt werden konnte, sowohl eine effiziente humorale und zelluläre, als auch in einigen Fällen eine mukosale Immunantwort (zur Übersicht: Burnett *et al.*, 2000; Ross, 1998; Rolph und Ramshaw, 1997). Der prominenteste Vertreter **viraler Vektorsysteme** ist das rekombinante **Vakzinia Virus (rVV)** (Hu *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1993, zur Übersicht: Paoletti, 1996). Zur Verbesserung der Sicherheit dieses Impfstoffes, wurden mittlerweile auch apathogene Varianten des Vakzinia Virus gentechnisch oder durch serielle Passagierung des parentalen Vakziniasammes in Zellkultur generiert. Die Immunogenität und Sicherheit der auf diese Weise hergestellten, viralen Vektoren **NYVAC** (New York vaccinia virus) (Tartaglia *et al.* 1992 und 1994) und **MVA** (modified vaccinia Ankara) (Sutter und Moss 1992 und 1995; Hanke und McMichael 1999; Moss *et al.*, 1996; Seth *et al.*, 1998) sowie das tierpathogene, rekombinante **Canarypox Virus (ALVAC)** (Egan *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996; Girard *et al.*, 1997; Clements-Mann *et al.*, 1998, Evans *et al.*, 1999; Belshe, *et al.*, 1998) wird derzeit detailliert in initialen klinischen Studien der Phase I/II getestet. Weitere mögliche Kandidaten viraler Vektorsysteme stellen rekombinante Rhinoviren, Polioviren, SFV (Semliki Forest Virus), Adenoviren und VEE-Viren (Venezuelan equine encephalitis virus) dar, über deren Sicherheit und Wirksamkeit in höheren Tiermodellen allerdings noch keine detaillierten Daten vorliegen (Evans *et al.*, 1989; Alexander *et al.*, 1994; Natuk *et al.*, 1994 und 1995; Morrow *et al.*, 1994; Brand *et al.*, 1998; Berglund *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998; Caley *et al.*, 1997 und 1999). Attenuierte Stämme von *Listeria monocytogenes* (Frankel *et al.*, 1995, Friedman *et al.*, 2000; Rayevskaya *et al.*, 2001) und *Salmonella sp.* (Berggren *et al.*, 1995, Hone *et al.*, 1994 und 1996), sowie Bacillé Calmette Guérin (BCG) (Berthet 1998, Falk *et al.*, 2000) sind Beispiele **bakterieller Vektorsysteme**, die bereits in verschiedensten klinischen Studien erfolgreich getestet wurden. Jeder diese Impfstoffe kann allerdings nur einmal appliziert werden, da aufgrund der induzierten Immunantwort gegen den Vektor selbst wiederholte Auffrischimpfungen wirkungslos bleiben.

Die Mehrzahl moderner Vakzine-Konzepte beruht auf der Synthese von für Antigene kodierenden Genen zur Entwicklung von DNA-Vakzine Kandidaten und rekombinanten viralen bzw. bakteriellen Vektoren. Initiiert wurde diese Entwicklung vor allen von den ersten Beobachtungen in den 90iger Jahren, daß durch Applikation nackter Plasmid-DNA, welche für z.B. virale Antigene kodiert, effiziente Immunantworten induziert werden können.

A.5 DNA-Immunisierung: Mechanismen der Immuninduktion, Wirksamkeit und Risiken

Entwicklung eines neuartigen auf DNA basierenden Impfstoffes

Bereits im Jahre 1962 beobachtete man, daß die Bildung eines Tumors in neugeborenen Hamstern durch subkutane Applikation gereinigter Polyomavirus-DNA und die dadurch induzierten Polyoma-spezifischen Antikörper verhindert werden kann (Atanasiu *et al.*, 1962). Erst

viele Jahre später wurde die Technologie der DNA-Injektion, d.h. die Verabreichung nackter für spezifische Proteine und Antigene kodierender Expressionsplasmide, sowohl als neuartige Immunisierungsstrategie als auch für gentherapeutische Zwecke wieder aufgegriffen (Wolff *et al.*, 1990 und 1991). So konnte initial gezeigt werden, daß eine intramuskuläre Immunisierung von Mäusen mit Plasmid-DNA, welche für das Influenza Nukleoprotein NP kodiert, eine Immunantwort induzieren und die Tiere vor einer tödlichen Dosis infektiöser Viren schützen kann (Tang *et al.*, 1992; Ulmer *et al.*, 1993; Fynan *et al.*, 1993). Neben der Induktion Antigen-spezifischer Antikörper, die in vielen Fällen noch etwa 12 Monate nach der Immunisierung nachweisbar waren, konnten des weiteren -im Gegensatz zur herkömmlichen Spaltvakzine-Antigen-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten und CD4⁺ T-Helferzellen stimuliert und somit insbesondere die zellulären Immunabwehrreaktionen effizient induziert werden (zur Übersicht: Ulmer *et al.* 1996; Donnelly *et al.*, 1997, McDonnell und Askari, 1996; Robinson, 1997; Liu und Ulmer 2000; Gurunathan *et al.*, 2000).

In den vergangenen Jahren wurde wiederholt die Wirksamkeit der DNA-Vakzine im Tiermodell demonstriert. So wurden effiziente DNA-Vakzine Kandidaten gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen viralen und bakteriellen Krankheitserregern, wie z.B. dem Influenza Virus, Tollwutvirus, HBV (Hepatitis B Virus), HCV (Hepatitis C Virus), Dengue Virus, hCMV (humanes Cytomegalie Virus), HSV-1 und HSV-2 (Herpes simplex Virus), Masernvirus, Rotavirus, Hantavirus, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium sp.* oder *Leishmania sp.* entwickelt und deren Immunogenität analysiert (zur Übersicht: Schultz *et al.* 2000). Daneben wurden in den vergangenen 10 Jahren auch verschiedenste HIV/AIDS-spezifische DNA-Vakzine Kandidaten entwickelt und in unterschiedlichen Tiermodellen getestet (Robinson, *et al.* 1997; Wang *et al.* 1995; Okuda *et al.*, 1995; Fuller *et al.*, 1997; Shiver *et al.*, 1997; zur Übersicht: Schultz, 1998; Barouch und Letvin, 2000). Dabei konnten sowohl neutralisierende Antikörper, als auch effiziente T_H-proliferative und ZTL-vermittelte Immunantworten gegen eine Vielzahl von HIV bzw. SIV Antigenen induziert werden. Obwohl immunisierte Schimpansen (Boyer *et al.*, 1997) und Makaken (Lu *et al.*, 1996; Letvin *et al.*, 1997; Barouch *et al.* 2000) vor einer Infektion mit nicht-pathogenem Impfvirus geschützt waren, war die induzierte Immunantwort in vielen Fällen dennoch nicht ausreichend, um die Tiere gegen eine Infektion mit pathogenen Virenstämmen, wie z.B. SIVmac251 (Lu *et al.*, 1996) und SHIV89.6P (Robinson *et al.*, 1995), zu schützen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden verschiedenste HIV-spezifische DNA-Vakzine Kandidaten in Primatenstudien, als auch in den laufenden humanen, klinischen Studien der Phase I/II (MacGregor *et al.*, 1998, Boyer *et al.*, 2000), erfolgreich in Kombination mit Spaltvakzinen (rgp120), Pseudovirionen oder rekombinantenvirale Vektoren, wie z.B. ALVAV und MVA (Hirsch *et al.*, 1996; Letvin *et al.*, 1997; Kent *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998; Heeney *et al.*, 1999, Amara *et al.* 2001) auf ihre Immunogenität hin untersucht und deren Sicherheit überprüft.

Immunisierungsroute und Verabreichungsform der DNA-Vakzine

Die Verabreichung der Plasmid-DNA in wäßriger Salzlösung kann **subkutan** (s.k.), **mukosal**, **intravenös** (i.v.), oder, wie am häufigsten angewandt, **intramuskulär** (i.m.) erfolgen. Bei der intramuskulären Immunisierung werden nur etwa 5% der Myofibrillen tatsächlich transfiziert. Die injizierte DNA liegt meist episomal vor und kann über einen Zeitraum von etwa 1-2 Monaten im Skelettmuskel (Davis *et al.*, 1993), aber auch in einer Vielzahl von anderen Organen, wie z.B. der Lunge oder Leber und somatischen Zellen, wie z.B. Hautzellen und Endothelzellen der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden (Wolff *et al.*, 1992; Nabel *et al.*, 1992; Winegar *et al.*, 1996; Raz *et al.*, 1994; Tadokoro *et al.*, 2001). Trotz der geringen Transfektionseffizienz *in vivo* und der Tatsache, daß die Muskelzelle an sich aufgrund der geringen Konzentration von MHC-

Klasse I Molekülen auf der Oberfläche und dem Fehlen ko-stimulatorischer Membranproteine (B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86)) *per definitionem* keine professionelle Antigen-präsentierende Zelle (APC; *antigen presenting cells*) ist, werden durch die intramuskuläre Applikation der DNA-Vakzine effiziente Immunantworten induziert. Zur gezielten Transfektion professioneller Antigen-präsentierender Zellen, wie z.B. die Langerhans Zellen der Haut, mit dem Ziel die induzierten Immunantworten zu erhöhen, kann die DNA an inerte Gold-Partikel gekoppelt und mit Hilfe einer Helium-Druck-Pistole („*gene gun*“; **Gene Gun Immunisierung**) in die Dermis appliziert werden (Eisenbraun *et al.*, 1993; Pertmer *et al.*, 1995; zur Übersicht: Haynes *et al.*, 1996). Obwohl hierbei nur vergleichsweise um den Faktor 1000 geringere Mengen an Plasmid DNA benötigt werden, erzielte man im Vergleich zur Immunisierung von nackter DNA in höheren Tiermodellen nur geringe Erfolge. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die *in vivo* Transfektionseffizienz nicht unbedingt mit der Effizienz der Induktion von Immunantworten korrelieren muß. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß sowohl die Immunisierungsrouten als auch die Verabreichungsform die Art der Immunantwort nachhaltig beeinflusst (Feltquate *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1997; Dupuis *et al.*, 2000). So induziert die Immunisierung von „nackter“ DNA in gepufferter Salzlösung im Mausmodell unabhängig davon, ob sie i.d. oder i.m. verabreicht wurde, eine T_H1 vermittelte Immunantwort, die durch $IFN-\gamma$ produzierende $CD4^+$ T-Helferzellen und der Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG2a gekennzeichnet sind und die Induktion zellulärer Abwehrreaktionen stimulieren. Die Verabreichung der DNA mit der *gene gun* generiert dagegen grundsätzlich eine T_H2 -vermittelte Immunantwort. Diese wiederum ist durch eine verstärkte humorale Immunantwort, die sich in der Bildung IL-4 und IL-5 sezernierender $CD4^+$ T-Zellen und Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG1 äußert, gekennzeichnet (Pertmer *et al.*, 1996; Raz *et al.*, 1994).

DNA-Immunisierung: Mechanismen der Induktion einer Immunantwort

Der Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort geht im wesentlichen eine Stimulation naiver T-Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. den lokalen Lymphknoten, voraus. Sowohl naive **$CD4^+$ T-Helferzellen**, wie auch **$CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten** sind von der Präsentation der Antigene auf den Molekülen der **MHC-Klasse I ($CD8^+$)** bzw. **MHC-Klasse II ($CD4^+$)**, sowie zusätzlicher **ko-stimulatorischer Faktoren**, wie z.B. löslichen Zytokinen ($IFN-\gamma$, IL-12, $TNF-\alpha$, etc.) und weiteren zellulären Interaktionen, abhängig. Die Aktivierung naiver $CD8^+$ zytotoxischer T-Lymphozyten benötigt zudem die Hilfe Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen (zur Übersicht: York und Rock 1996, Watts, 1997).

Da -wie bereits erwähnt- somatische Zellen eine im Vergleich zu Immunzellen geringe MHC-Klasse I Expression und keine ko-stimulatorischen Faktoren exprimieren bzw. sezernieren, kann die Expression einer *in vivo* transfizierten somatischen Zellen nicht allein für die Induktion einer effizienten humoralen und zellulären Immunantwort verantwortlich sein. Der genaue, detaillierte Mechanismus der Induktion einer initialen Immunantwort nach Verabreichung von Antigen-kodierender Plasmid-DNA ist bislang im Detail unbekannt. Diskutiert werden unter anderem eine Antigen-Präsentation (a) der *in vivo* transfizierten Gewebszellen, wie z.B. Muskelzellen (Torres *et al.*, 1997; Ulmer *et al.*, 1997) oder (b) der direkt *in vivo* transfizierten professionellen APZs, wie z.B. dendritischen Zellen (DC, „*dendritic cells*“) und Monozyten/Makrophagen des umliegenden Gewebes („**direct priming**“) (Ulmer *et al.*, 1996; Chattergoon 1998, Porgador *et al.*, 1998; Akbari *et al.*, 1999) aber auch (c) ein „**Cross-priming**“ (Fu *et al.*, 1997; Ulmer und Otten, 2000; Cho *et al.*, 2001), wobei das aus transfizierten somatischen Zellen z.B. durch Sekretion bzw. spontane Zellyse freigesetzte, lösliche Antigen oder aber apoptische Vesikel (Davis *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1998; Akbari *et al.*, 1999; Chattergoon

et al., 2000) exogen von professionellen APZ aufgenommen und somit eine Immunantwort induziert wird.

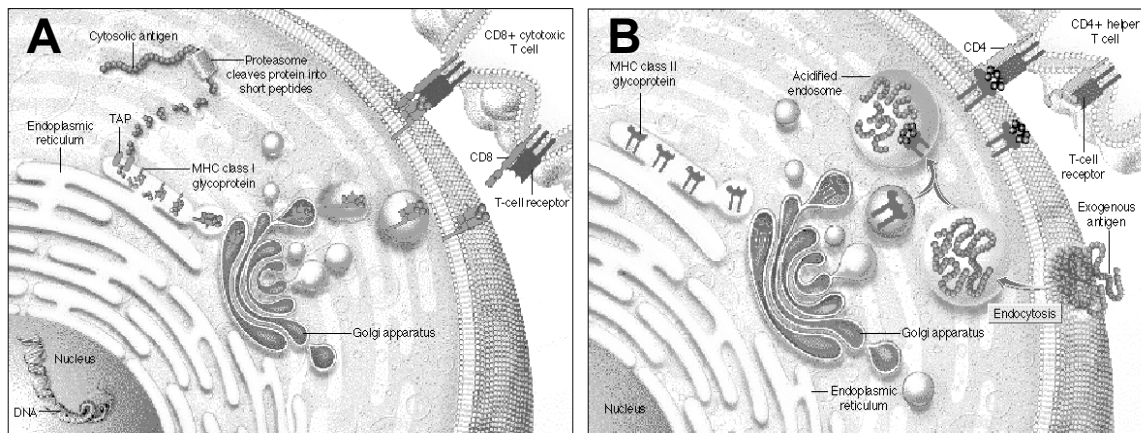


Abbildung A-6 Induktion zellulärer Immunantworten: Schematische Übersicht über die MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Präsentation exogener und endogener Antigene. **(A)** Endogene Antigene werden proteasomal degradiert und die Peptide über einen Membran-assoziierten Transporter (TAP; „transporter associated with antigen processing“) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert. Die Peptide (aa. 9-10) werden anschließend von MHC-Klasse I Molekülen gebunden und als trimere Komplex (MHC-I/ β -Mikroglobulin/Peptid) an die Oberfläche transportiert. Die Erkennung des Komplexes durch $CD8^+$ T-Zellen erfolgt über das CD8 Molekül, dem T-Zell spezifischen Rezeptor (TCR) sowie weitere ko-stimulatorische Zell-Zell Kontakte, wodurch die Proliferation der $CD8$ -positiven Lymphozyten stimuliert wird. **(B)** Exogene Proteine werden durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen und lysosomal degradiert. Anschließend komplexieren die Peptide in den Endolysosomen mit MHC-Klasse II Molekülen und werden an die zelluläre Oberfläche transportiert. Die Erkennung des Komplexes durch $CD4^+$ T-Zellen erfolgt über das CD4 Molekül, dem T-Zell spezifischen Rezeptor (TCR) sowie weitere ko-stimulatorische Zell-Zell Kontakte, wodurch die Proliferation von T_H -Lymphozyten stimuliert wird. (modifiziert nach MacDonnell et al., 1996).

Eine Schlüsselposition bei der Induktion der initialen Immunantwort nehmen mit Sicherheit die **professionellen APZs (pAPZ)** ein, welche in einer Vielzahl von Organen und Geweben, wie z.B. der Haut (epidermale Langerhans Zellen (LC, „Langerhans cells“)) und dem Intestinum (intestinale DCs), lokalisiert sind und den Ort der Antigenexpression mit dem der lymphatischen Organe miteinander verbinden (Pavli et al., 1996; Doe et al., 1996; Corr et al., 1996; Iwasaki et al., 1999 und 2000, Abkabari et al., 1999; zur Übersicht: Takashima et al., 1999.). Nach Aufnahme von Antigen differenzieren diese und „wandern“ in die umliegenden **sekundären, lymphatischen Organe**. Dort findet schließlich die Antigen-spezifische Stimulation **naiver T-Lymphozyten** statt, die wiederum in die **primären Lymphorgane**, wie z.B. der Milz einwandern und die Bildung **langlebiger Gedächtniszellen (MC, „memory cells“)** induzieren können. Ausschließlich APZs sind in der Lage Antigene sowohl MHC-Klasse I als auch MHC-Klasse II restringiert zu präsentieren (Staerz et al., 1987; Harding et al., 1994) und somit beide Arme des Immunsystems initial und trotz geringer Konzentration an Antigen effizient zu induzieren und über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. So sind **direkt transfizierte DCs** in der Lage die jeweiligen Antigene sowohl auf dem MHC-Klasse I als auch MHC-Klasse II Weg zu präsentieren (Porgador et al., 1998; Casares et al. 1997; Condon C. et al., 1996; Chattergoon et al., 1998). Die Aufnahme sekretorischer oder durch spontane Zellyse von anderen, direkt transfizierten Zellen freigesetzter löslicher Antigene führt zur klassischen MHC-Klasse II Präsentation exogener Antigen durch die APZs (zur Übersicht: Watts, 1997). Ferner sind DCs unter bestimmten Voraussetzungen, wie z.B. der Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine, in der Lage exogene Antigene bzw. apoptotische Vesikel (Albert et al., 1998, Rovere, et al. 1998 und 1999) oder komplexe und partikuläre Proteinantigene, wie z.B. HBsAg (Wild et al., 1999) auch MHC-Klasse I

restringiert zu präsentieren und mit Hilfe aktivierter CD4 T-Zellen naive CD8⁺ zytotoxische T-Zellen zu stimulieren (Bennett et al., 1997; Reimann und Schirmbeck 1999). Demgegenüber ist die Rolle der *in vivo* transfizierten **Muskelzellen** umstritten. Durch Transplantation von transfiziertem Muskelgewebe konnte gezeigt werden, daß die Antigen Expression von somatischen Zellen, wie z.B. Muskelzellen für eine T-Zell Aktivierung ausreichend sein kann (Torres et al., 1997; Ulmer et al., 1996), aber diese in vielen Fällen zur Induktion einer zellulären Immunantwort nicht essentiell ist (Ulmer et al., 1996; Condon et al., 1996). Die Beobachtung allerdings, daß bei wiederholter i.m. DNA-Injektion auch zelluläre, zytotoxische Immunreaktionen gegen Antigen exprimierende Muskelzellen detektiert werden konnten, zeigt dennoch, daß diese in der Lage sind Antigen zu exprimieren und MHC-Klasse I restringiert auf der Oberfläche zu präsentieren.

Vermutlich ist es gerade das Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen und/oder verschiedener zellulärer Effektoren, die zur hohen Immunogenität der DNA-Vakzine *in vivo* beiträgt. Doch gerade im Hinblick auf die Verbesserung der DNA-Vakzine als zukünftigen Impfstoff, sowie zur gezielten Induktion der Immunantwort ist die Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen im Detail essentiell.

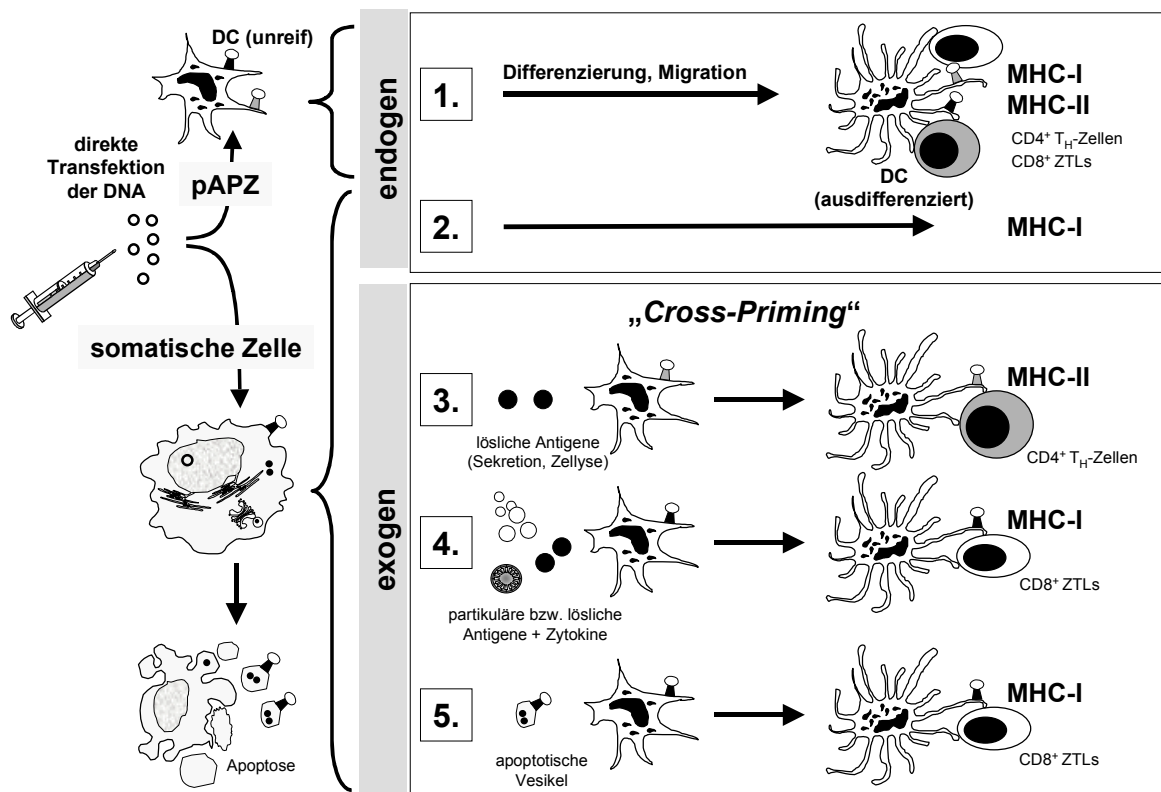


Abbildung A-7 Modell der Antigenpräsentation und Induktion primärer Immunantworten nach Vakzinierung nackter Plasmid DNA (DNA-Vakzine). **(1)** Die direkte Transfektion professionellen Antigen-präsentierender Zellen (pAPZ) nach DNA-Immunisierung, induziert dessen Differenzierung und Migration in das umliegende lymphatische Gewebe, wobei das endogen exprimierte und proteasomal prozessierte Antigen sowohl MHC-Klasse I wie auch MHC-Klasse II restringiert präsentiert werden kann („direct priming“). **(2)** Direkt transfizierte somatische Zellen (z.B. Muskelzellen) präsentieren endogene Antigenen MHC-Klasse I restringiert, doch das Fehlen ko-stimulatorischer Signale ist vermutlich nicht ausreichend um die Proliferation CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen (ZTLs) zu stimulieren und eine zelluläre Immunantwort zu induzieren. **(3)** Einige exprimierte Antigene werden von somatischen Zellen sezerniert (z.B. Sekretproteine) oder passiv durch spontane Zellyse freigesetzt (z.B. zytotoxische Genprodukte). Diese löslichen, exogenen Antigene werden von APZs aufgenommen, lysosomal degradiert und i.d.R. MHC-Klasse II restringiert CD4⁺ T_H-Zellen präsentiert. **(4)** Von somatischen Zellen freigesetzte, partikuläre Antigene (z.B. HIV-1 Pr55^{gag}-VLPs), Lipid-assoziierte Antigen aber auch lösliche Antigene unter gewissen Voraussetzungen, wie z.B. bei starken, durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IFN- γ) gekennzeichneten Entzündungsprozessen, können von APZs aufgenommen und auch MHC-Klasse I restringiert präsentiert werden, um so die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort zu stimulieren. **(5)** Einige intrazelluläre Antigene induzieren die Apoptose von somatischen Zellen. Die Aufnahme dieser apoptotischen, das Antigen beinhaltender Vesikel, durch die APZs führt ebenfalls zur MHC-Klasse I restringierten Präsentation der Antigene. Die in 3-4 beschriebenen Mechanismen werden „Cross-Priming“ genannt.

Vorteile und Risiken der DNA Immunisierung

Neben der hohen Immunogenität der DNA-Vakzine sind die wirtschaftlichen und produktionstechnischen Vorteile der DNA-Vakzine gegenüber herkömmlichen Impfstoffen, wie z.B. der Spaltvakzine offensichtlich. So ist diese in großen Mengen kontaminationsfrei produzierbar und aufgrund der hohen Stabilität sowie Temperaturbeständigkeit über einen längeren Zeitraum stabil lagerbar. Bevor allerdings eine potentielle DNA-Vakzine für klinische Studien der Phase II und III zugelassen werden kann, müssen nicht nur **toxikologische Eignungstests** durchgeführt, sondern auch die Sicherheit der Vakzine Kandidaten gerade bei neuartigen Impfstoffen genauestens überprüft werden (Smith, 1994; zur Übersicht: Robertson, 1994; Klinman *et al.*, 1997). Da bislang sowohl Unklarheiten über den eigentlichen Ort, als auch die Dauer der Expression der jeweiligen Antigene in höheren Primaten bestehen, befürchtet man nicht zu Unrecht die Induktion einer **Immuntoleranz** gegen das Fremdanigen aufgrund einer geringen, jedoch langanhaltenden Expression in z.B. generativen Zellen (Mor *et al.*, 1996). Auch die Induktion von **Autoimmunreaktionen** durch die Bildung von anti-DNA Antikörper scheint zunächst berechtigt (Moens *et al.*, 1995; Gilkeson *et al.*, 1995; Krieg, 1995; Mor *et al.*, 1997). Diese könnten durch immunstimulatorische Effekte bakterieller DNA aufgrund nicht-methylierter CpG-Motive auf humane, immunregulatorische Zellen begünstigt werden (zur Übersicht: Pissetsky, 1996; Krieg *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1996). Ein seit Beginn der Technologie der DNA-Vakzine stark umstrittenes Risiko ist die **Integration** der Plasmid DNA in das menschliche Genom der Zielzelle. Dieser Insertions-Prozeß könnte aufgrund einer möglichen Aktivierung eines Onkogens bzw. Deaktivierung eines Tumorsuppressorgens zum Verlust der kontrollierten Zellteilung und somit zu einer Tumorerkrankung führen (Doerfler *et al.*, 1995; Krishnan *et al.*, 1995; Remus *et al.*, 1999; Kurth *et al.*, 1995; Nichols *et al.*, 1995 und 1996). Obwohl die Wahrscheinlichkeit für einer dieser Erkrankungen gering ist, wird bei der Entwicklung neuartiger DNA-Impfstoffe darauf Wert gelegt, diese Risiken bereits im Vorfeld zu minimieren oder gegebenenfalls gänzlich auszuschließen.

A.6 Zielsetzung der Arbeit

Die DNA-Immunisierung stellt eine neuartige Impfstrategie dar, welche in der Lage ist, sowohl eine effiziente humorale als auch zelluläre Immunantwort gegen das entsprechende Genprodukt zu induzieren. Aufgrund der bereits erzielten Erfolge in prä-klinischen Studien wird weltweit an der Optimierung der DNA-Vakzine als potentiellen Impfstoff gearbeitet, um diese insbesondere als Komponente eines umfassenden HIV/AIDS-Vakzine Konzepts zu integrieren. Dazu zählt die Optimierung der Genexpression, Immunogenität, der Verabreichungsform und nicht zuletzt der Sicherheit der DNA-Vakzine. Daneben gilt es für jedes individuelle HI-virale Antigen die beste Form der DNA-Vakzine zu synthetisieren, um so einen umfassenden und langanhaltenden Schutz *in vivo* zu generieren. Voraussetzung dafür sind allerdings umfassende Kenntnisse über den Erreger selbst, die jeweiligen immunologischen Korrelate des Schutzes sowie die prinzipielle Wirkungsweise der DNA-Vakzine. Unter diesen Aspekten sollten im Rahmen der vorgelegten Dissertation potentielle **DNA-Vakzine Kandidaten** gegen (i) das HI-virale Strukturprotein **Gag** und (ii) das Regulatorprotein **Tat** entwickelt und deren Immunogenität im Balb/c-Mausmodell evaluiert werden.

Hierzu sollte zunächst die Zellspezifität der Genexpression verschiedener Gag-spezifischer DNA-Vakzine Vektoren, sowie die Eigenschaften der exprimierten Proteine vergleichend untersucht werden, um auf diese Weise einen geeigneten DNA-Vakzine Kandidaten zu ermitteln. Die Immunogenität dieser DNA-Vakzine sollte des weiteren detailliert in einer Balb/c-Immunisierungsstudie charakterisiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung und Untersuchung unterschiedlicher Strategien zur Modulation der *in vivo* induzierten Gag-spezifischen Immunantwort, um auf diese Weise durch eine gezielte Immuninduktion die Effektivität und die Sicherheit der DNA-Vakzine Vektoren zu verbessern. Diesbezüglich sollte z.B. der Einfluß der Lokalisation sowie der Stabilität des Antigens auf die jeweilig induzierten Immunantworten untersucht und die Effizienz monovalenter Minigen-Immunisierungen sowie myogener DNA-Vakzine Vektoren evaluiert und diskutiert werden. In einem weiteren Projekt sollten unterschiedliche Tat-spezifische DNA-Vakzine Kandidaten in heterologen Zellkultursystemen hinsichtlich der Expression und der molekularbiologischen Eigenschaften ihrer Genprodukte analysiert werden. Die Immunogenität dieser Impfstoffe sollte anschließend vergleichend in einer Balb/c-Immunisierungsstudie charakterisiert werden.

Die dabei entwickelten Strategien zur Optimierung der Immunogenität und der Sicherheit Gag-spezifischer bzw. Tat-spezifischer DNA-Vakzine Kandidaten sollten die Grundlage bilden, um erweiterte und an SIV bzw. an ein C-Typ Primärisolat (Su *et al.* 2000) adaptierte HIV/AIDS-Impfstoffe zur Durchführung prä-klinischer und humaner Phase I/II Studien zu generieren.

B Material und Methoden

B.1 Reagenzien

Alle Chemikalien wurden -wenn nicht anders angegeben- von SIGMA (Deisenhofen), FLUKA Chemie (Buchs, CH) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Ansonsten werden die Herstellerfirmen der verwendeten Reagenzien, Enzyme und Chemikalien an entsprechender Stelle genannt. Ein Großteil der HIV-spezifischen rekombinanten Proteine, Antikörper sowie z.T. auch Plasmide wurden von einer zentralisierten Vergabestelle HIV/AIDS-spezifischer Reagenzien in Großbritannien, der NIBCS *Centralised Facility for AIDS Reagents* (NIBCS-CFAR) und dem *UK Medical Research Council* (MRC), bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten HIV-spezifischen Gen,- und Aminosäuresequenzen entstammen dem **Klon BH10 des französischen HIV-1 Subtyp B Isolates LAI/IIIB** (accession number: M15654; Ratner *et al.*, 1985). Als Matrize der Klonierungen diente hierbei das Provirusplasmid pHX10, welches die provirale Sequenz von BH10 mit den flankierenden LTR-Regionen des Isolate HXB2 enthält (Ratner *et al.*, 1987).

B.2 Gentechnische Arbeitsmethoden

Für Klonierungen und zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde ausschließlich der dam/dcm-positive *Escherichia coli* **K12-Stamm DH5 α** (Hanahan und Meselson, 1983) verwendet. Die Anzucht positiver Transformanden erfolgte unter Ampicillin-Selektion (100 μ g/ml) auf LB-Agarplatten oder in LB (*Luria Bertani*) -und TB (*Terrific Broth*)-Flüssigmedien. Zur Charakterisierung hergestellter Subklone wurde die **Plasmid-DNA** mittels alkalischer Lyse isoliert (nach Birnboim und Doly, 1979). Größere Mengen eukaryontischer Expressionsplasmide für Transfektionsanalysen wurden über Nucleobond-Tip AX500-Säulen nach Angaben des Herstellers gereinigt (Macherey & Nagel, Düren). Die Reinheit (A_{260}/A_{280}) und Konzentration der gereinigten DNA wurde durch Messung des Adsorptionsspektrums (A_{230} - A_{300}) ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($1 \text{ OD}_{258} = 47,5 \mu\text{g dsDNA/ml}$) berechnet. Für analytische und präparative Zwecke wurden je 1 μ g Plasmid-DNA endonukleolytisch mit Hilfe von 10U Restriktionsendonukleasen (Roche, Mannheim; New England BioLabs, Schwalbach-Taunus) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Auftrennung der DNA Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (50ng/ml Ethidiumbromid) erfolgte in 1xTAE-Puffer (40mM Tris/HCl, pH 8.0; 20mM NaAc, 2mM EDTA). Die **Isolierung** definierter DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction*“-Kits, die Aufreinigung von DNA nach Restriktionen und PCR-Amplifikation mit Hilfe des „*QIAquick Purification*“-Kit (Qiagen, Düren) durchgeführt. Zur **kovalenten Verknüpfung** von Vektor- und Insert DNA wurden diese in variablen Verhältnissen (1:2-1:10) nach Angaben des Herstellers mit je 10U T4-Ligase verknüpft (New England BioLabs, Schwalbach Taunus). Die **Transformation** von 1 μ g Plasmid-DNA bzw. 10 μ l des Ligationsansatzes in transformationskompetenten Bakterienzellen, hergestellt nach der RbCl-Methode, erfolgte durch die „Hitze-Schock“ Methode bei 42°C. Die Amplifikation definierter DNA-Fragmente und die Herstellung synthetischer Gensequenzen wurde unter Verwendung der Pfu-Polymerase bzw. der Taq/Pfu-Precision mit allgemeinen **PCR**-Techniken (Graf M. *et al.*, 2000) sowie nach Angaben des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Beide Enzyme besitzen eine 3'-5' Exonuklease Aktivität („*proof-reading*“), wodurch eine fehlerfreie Amplifikation gewährleistet wird. Die Einführung von Sequenzveränderungen in doppelsträngige Plasmid DNA (**Mutation**) wurde unter Verwendung des „*QuickChange Site-Directed Mutagenesis*“-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Stratagene; Heidelberg). Die Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide sind an den entsprechenden Stellen verzeichnet. Die **Subklonierung** von *blunt-end* PCR-Fragmenten in den bakteriellen Expressionsvektor pcR-ScriptTM erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene, Heidelberg). Zur Selektion positiver Rekombinanten wurden die transformierten Bakterien auf LB_{amp}-Agarplatten, supplementiert mit 1mM IPTG (Roth, Karlsruhe) und 40 μ g/ml Bluo-Gal (Biomol, Hamburg), kultiviert. Alle Klonierungen und eingeführten Mutationen wurden durch **Sequenzanalysen** nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) verifiziert und überprüft. Zur Sequenzierung wurden die Vektor-spezifischen Oligonukleotide T7/f (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'), T3/f (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3') und Sp6/r (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'), CMV/f (5'-GAG GTC TAT ATA AGC AGA GC-3') und pcDNA3/f (5'-

GCA TTT ATC AGG GTT ATT GTC TC-3') sowie die Gag-spezifischen Oligonukleotide sgag1/f (5'-GAC CAA CAC CGC CAC CAT CAT GAT GC-3'), sgag2/f (5'-GGA GCT GTA CCC CCT GAC CAG CCT GAG G-3') und sgag3/f (5'-GGA GCC ACC CCC CAG GAC CTG AAC ACC-3') verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, München synthetisiert.

B.3 Allgemeine Zellkulturtechniken, Transfektion und Analyse der Genexpression in eukaryontischen Zellen

B.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken und Zelllinien

Die Kultivierung immortalisierter, **adhärenter, eukaryontischer Zellen** erfolgte in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (**DMEM**) mit 2mM L-Glutamin, D-Glukose (4,5mg/ml), 1mM Natriumpyruvat, angereichert mit 10% Hitze-inaktiviertem (56°C, 30min) fötalem Rinderserum (FKS, „föta! calf serum“), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml). Das Medium zur Kultivierung der CD4-positiven HeLa-LTR-βGal Indikatorzelllinie MAGI wurde zur Selektion zusätzlich mit G418 (0,2mg/ml) und Hygromycin B (0,1mg/ml) versetzt. Die Kultivierung der stabilen, Rev exprimierenden Zelllinien erfolgte in Vollmedium, welches mit G418 (0,2mg/ml) versetzt wurde. Die murinen **Suspensionzelllinien** A-20 und P815 wurden in **RPMI 1640-Medium** mit 2mM L-Glutamin, D-Glukose (4,5mg/ml), Natriumbikarbonat (1,5mg/ml), supplementiert mit 10mM HEPES; 1mM Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem FKS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) kultiviert. Die Zellen wurden in 20ml Medium in 75cm²-Zellkulturflaschen (BD, Heidelberg) bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert und, wie in nachstehender Tabelle angegeben, nach Erreichen der Konfluenz subkultiviert. Sämtliche Zellkulturmedien und Antibiotika, wurden von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Alle für die Zellkultur verwendeten Chemikalien waren speziell für Zellkulturen getestet und wurden von Life Technologies (Karlsruhe), BD (Heidelberg) oder SIGMA (Deisenhofen) bezogen.

Bezeichnung		Herkunft	Beschreibung
H1299	1:10	human	p53-negative Lungenkarzinomzellen (Mitsudomi et al., 1992)
293T	1:5	human	Ad5/SV40 (T) transformierte Nierenepithelzellen (T.Dobner, IMMh Rgbg.)
MAGI	1:7	human	CD4 ⁺ /LTR-β-Gal HeLa, HPV-18 transformierte Cervixkarzinomzellen (Kimpton und Emermann, 1992)
COS-7	1:7	Affe	SV40 transformierte Nierenfibroblasten (ATCC: CRL-1651)
Balb/c 3T3	1:5	murin	embryonale Fibroblastenzellen (T.Dobner, IMMh Rgbg.)
C₂C₁₂	1:10	murin	undifferenzierte Myoblasten (ATCC: CRL-1772)
mKSA	1:5	murin	SV40-transformierte Fibroblasten (Walser et al. 1989)
CHO	1:8	Hamster	„Chinese Hamster“ Ovarienzellen (ATCC: CCL-61)
BHK-21	1:10	Hamster	„Syrian gold“ Nierenfibroblasten (ATCC: CCL-10)
A-20	1:10	murin	Lymphoblasten, Haplotyp: H-2 ^d (ATCC: TIB-208)
P815	1:20	murin	Mastocytomazellen Haplotyp: H-2 ^d (ATCC: TIB-64)

B.3.2 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Die transiente Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen wurde i.d.R. durch Transfektion diverser eukaryontischer Expressionsplasmide auf der Basis von pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen, Groningen, NL) erzielt. Die Expression der in den Polylinker von pcDNA3.1 (5.4kb) inserierten Fremdgene steht hierbei unter der Kontrolle des konstitutiven hCMV-immediate early Promotors (hCMV, „human cytomegalie virus“). Die Polyadenylierung der Transkripte wird durch eine BGHpolyA-Signalsequenz (BGH, „bovine growth hormone“) initiiert. Zusätzlich trägt dieser Vektor ein Neomycin-Resistenzgen (Neo^R),

welches von einem SV40-Promotor und einem SV40 Polyadenylierungssignal (SV-40, *Simian virus*) flankiert ist. Nach Möglichkeit besitzen alle inserierten Gene in der Umgebung des Translationsinitiationskodons AUG eine die Translationsinitiation fördernde Kozak-Konsensus Sequenz -GCC GCC ACC AUG XXX- (Kozak *et al.*, 1987).

B.3.2.1 CaHPO₄⁻-Transfektionen adhärenter, eukaryontischer Zellen

Zur transienten Expression viraler Proteine in adhärenenten, eukaryontischen Zellen wurden diese in Petrischalen (Ø 10cm) ausgesät (1-3x10⁶ Zellen/15ml Medium), 24h kultiviert und nach erneutem Medienwechsel mittels der Calciumphosphat-Präzipitation Technik (Graham und van der Erb, 1973; Jordan *et al.*, 1996) mit dem jeweiligem eukaryontischem Expressionsplasmid transfiziert. Hierzu wurden je 45µg DNA mit 90µl 2,5M CaCl₂ in einem Volumen von 900µl H₂O_{bid.} vereint und das Gemisch tropfenweise, unter leichtem Schütteln zu 900µl 2xHeBs (16,4g NaCl, 11,9g HEPES, 0,21g Na₂HPO₄ in 1 Liter H₂O_{bid.}, pH 7.05) pipettiert. Nach einer Inkubation von 5-10min (RT) wurde der Transfektionsansatz (1,8ml) gleichmäßig auf die Zellen gegeben. In Abhängigkeit der Zelllinie wurde der Zellrasen 8-16h nach Transfektion mehrmals mit PBS_{steril} (10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl) gewaschen und anschließend die Zellen für weitere 12-36h in 10ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden i.d.R. 36h, die Kulturüberstände 48h nach Transfektion geerntet. Für Transfektionen, die in 6-well Zellkulturschalen (Ø 3cm; 3-5x10⁵ Zellen/2-3ml Medium) durchgeführt wurden, wurde lediglich 1/3 des Volumens des beschriebenen Transfektionsansatzes verwendet.

B.3.2.2 Lipofektion von eukaryontischen Zellen

Zur Lipofektion von adhärenenten Zellen in Petrischalen mittels der „DOTAP liposomalen Transfektionsreagenz“ (Roche, Mannheim) wurden je 7,5µg Gesamt-DNA mit 20mM Hepes (pH 7.4) auf ein Endvolumen von 75µl gebracht und zu 140µl einer DOTAP/Hepes Lösung (45µl DOTAP) nach Angaben des Herstellers gegeben, gemischt und 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung gleichmäßig auf die Zellen (5ml Medium) gegeben. Nach einer Inkubation von 6-12h wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen für weiter 12-36h kultiviert (vgl. B.3.2.1.).

B.3.3 Analyse der transienten Proteinexpression

B.3.3.1 Gewinnung von Zellysaten

Zur Analyse der transienten Genexpression wurden die transfizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten, nach mehrmaligem Waschen des Zellrasens mit PBS, in 0,5-1ml PBS abgeschabt, und das Zellpellet nach Zentrifugation (300xg; 5min; 4°C) in 100µl (6-well) bzw. 300µl (Petrischale) „triple-detergent“ Lysepuffer (50mM Tris-HCl pH8.0; 150mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% Nonidet-40 (w/v); 0,5% Na-Deoxycholat (w/v)), der zuvor mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail, Complete™ (Roche, Mannheim) versetzt wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30min (4°C) und anschließender Zentrifugation wurde das Zellysat in ein neues 1,5ml ERG überführt (Lagerung: -20°C).

B.3.3.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge (µg/µl) in den aufbereiteten Zellysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford *et al.*, 1976) und wurde unter Verwendung der „Bio-Rad Protein Assay“ Reagenz (Bio-Rad, München) nach Angaben des Hersteller durchgeführt. Die Proteinmenge wurde näherungsweise anhand einer BSA-Eichgeraden bestimmt.

B.3.3.3 Anreicherung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs)

B.3.3.3.1 Aufreinigung von Virus-ähnlichen Partikeln

Zum Nachweis von Pr55^{gag}, - bzw. Pr160^{gagpol}-Lipoproteinpartikeln (VLPs) im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen, wurde der Überstand (10ml) durch Zentrifugation von Zellen und Zelltrümmern gereinigt und anschließend durch ein Kissen von 2ml 30% (w/v)-Saccharoselösung in PBS, 2½h bei 16°C und 28.000rpm (120.000xg) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50µl PBS aufgenommen und über Nacht (4°C) gelöst. Die aufgereinigten VLPs wurde entweder quantitativ im ELISA, oder qualitativ durch Western Blot Analyse analysiert.

B.3.3.3.2 Gleichgewichtszentrifugation: Bestimmung der Dichte von VLPs

Zur physikalischen Charakterisierung der Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel wurden diese zunächst aus je 10ml Kulturüberstand mittels Ultrazentrifugation durch ein 30%-iges Saccharosekissen aufkonzentriert und in 100µl PBS aufgenommen (vgl. B.3.3.3.1). Anschließend wurden die ÜN gelösten VLPs auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (2ml einer 10, 20, 30, 40 und 50% (w/v) in PBS) aufgetragen und 24h, bei 16°C und 28.000rpm (120.000xg) in das Gleichgewicht zentrifugiert. Auf diese Weise bandieren die Partikel in Abhängigkeit ihrer Dichte exakt in ihrer Schwebedichte. Anschließend wurden je 500µl Fraktionen von oben abgenommen und die Dichte (ρ [g/cm³]) der Saccharoselösung in den Fraktionen über den Brechungsindex mit dem Refraktometer bestimmt. Zudem wurden die Proteine mit NaDoc gefällt (vgl. B.3.3.3.3) und im Western Blot analysiert.

B.3.3.3.3 NaDoc-Fällung von Proteinen

Je 500µl der Fraktion wurde mit 475µl H₂O_{bid.} und 25µl Natrium-Deoxycholat (2%) versetzt und die Proteine nach einer Inkubation von 10min (4°C) nach Zugabe von 30µl TCA (40%) und einer weiteren 5-minütigen Inkubation (4°C) durch Zentrifugation (14.000rpm, 10min) gefällt. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit PBS wurden die gefällten Proteine zur Analyse im Western Blot in 50µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 100°C, 5min aufgekocht.

B.3.3.4 Analyse transienter Proteinexpression: SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Zur Analyse der Expression viraler Proteine wurden die Zellysate bzw. die aufgereinigten Partikelpräparationen mit 5x SDS Probenpuffer (312,5mM Tris-Cl, 6,8; 5% SDS, 25% β -Mercaptoethanol, 2,5mM EDTA, 25% Glycerin, 0,0125% Bromphenolblau) versetzt und 5min bei 95°C erhitzt. I.d.R. wurden gleiche Gesamtproteinmengen (z.B. 100µg) der zu untersuchenden Zellysate bzw. ½Vol. der Partikelpräparation entsprechend ihrem Molekulargewichts über ein **SDS-Polyacrylamidgel** aufgetrennt (Lämmli *et al.*, 1970). Die Prozentigkeit des Gels (7,5%-17%) richtete sich nach der zu erwartenden Größe des zu untersuchenden Proteins und ist an entsprechender Stelle angegeben. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend unter Verwendung einer „**SemyDry-Blotting**“-Apparatur nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße: 0,45µm bzw. 0,2µm) (Schleicher & Schuell, Dassel) in Transfer-Puffer (25mM Tris, 150mM Glycin, 10% MeOH, 0,1% SDS) überführt (Towbin *et al.*, 1979). Alternativ wurden hochmolekulare Proteine (> 120kDa) unter Verwendung einer **Elektro-Tank-Blot Apparatur** 2-3h auf die Membran transferiert. Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers bzw. zum Anzeichnen des Molekulargewichtsstandards (Bio-Rad, München) wurden die Proteine reversibel mit **Ponceau S** (0,5g P Ponceau S, 25ml Eisessig auf 500ml H₂O_{bid.}) angefärbt. Die Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte 1h (RT) in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 500mM NaCl)). Anschließend wurden die jeweiligen transient exprimierten Proteine spezifisch mit Hilfe unterschiedlich, in TBS,- bzw. TTBS-Puffer (TBS/0,05% Tween-20) verdünnten, spezifischen Primär-Antikörpern bzw. HRP (*Horseradish peroxidase*) oder AP (*Alkaline phosphatase*) konjugierten sekundären Antikörpern (vgl. Tab. B-1) nach herkömmlichen Methoden detektiert und analysiert (Sambrood *et al.*, 1989). Die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen wurden entweder über AP-Färbung (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer (100mM Tris-HCl, pH 9,5, 50mM MgCl₂,

100mM NaCl), HRP-Färbung (25ml Färbereagenz (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Ni₂Cl), 15ml H₂O₂, Spatelspitze DAB) oder über eine HRP-Enzym/Substrat vermittelte Lichtreaktion unter Verwendung des „ECL⁺-Western Blotting Detection System“ (Amersham, Braunschweig) autoradiographisch (KODAK BIOMAX-MR) entsprechend den Herstellerangaben detektiert. Die gescannten Membranen wurden mit Hilfe der „Adobe Photoshop“ Software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet.

Die unspezifische Färbung aufgetrennter Proteine direkt im Polyacrylamidgel erfolgte mittels der Coomassie Färbemethode. Dazu wurde das Gel mind. 5h in Coomassie-Blue Färbelösung (0,025% Coomassie R-250, 40% MeOH) inkubiert und anschließend mit einer 50% MeOH-Lösung entfärbt. Zur Konservierung wurden die Polyacrylamidgele mit Hilfe des „Dry Easy Systems“ (Invitrogen, Groningen, NL) nach Angaben des Herstellers 24-36h getrocknet.

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung
PRIMÄRE ANTIKÖRPER			
13/5	Wolf <i>et al.</i> , 1990	1:500	murin, monoklonal p24/55 _{III} (aa. 147-154)
16/4/2	Wolf <i>et al.</i> , 1990	1:2000	murin, monoklonal p24/55 _{III} (aa. 307-336)
3-H-7	Niedrig <i>et al.</i> , 1989	1:500	murin, monoklonal p17 _{III} (aa. 113-122)
α-p17	NIH/MRC: ARP431	1:500	Kaninchen, polyklonal p17 _{III} Serum
NEA-9305	Du Pont, Dreieich	1:100	murin, monoklonal gp120 _{III} (aa. 308-322)
9G2G4D6E8	Intracel, London U.K.	1:1000	murin, monoklonal Rev _{III} (aa. 70-84)
α-Tat	B. Ensoli, Rom, Italien	1:1000	Kaninchen, polyklonal Tat _{III}
ID9D5	NIH/MRC: EVA3021	1:1000	murin, monoklonal Tat _{III} (aa. 1-20)
NT3 2D1 1	NIH/MRC: ARP352	1:1000	murin, monoklonal Tat _{III} (aa. 72-81)
JLT-12	SIGMA, München	1:200	murin, monoklonal TroponinT
α-SC35	SIGMA, München	1:2000	murin, monoklonal SC-35 (Spleißfaktor)
anti-β-Aktin	SIGMA, München	1:5000	murin, monoklonal β-Aktin
FK2	BioTrend, Köln	1:1000	murin, monoklonal Ubiquitin
α-gp64	Hohmann <i>et al.</i> , 1983	1:4000	murin, monoklonal gp64 (Baculovirus)
α-GFP	Clontech, Heidelberg	1:500	Kaninchen, polyklonal α-GFP
SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER			
α-Maus-AP	Bio-Rad, München	1:2000	
α-Maus-HRP	DAKO, Hamburg	1:2000	
α-human-AP	DAKO, Hamburg	1:2000	
α-rabbit-AP	DAKO, Hamburg	1:2000	
α-rabbit-HRP	Pierce, Bonn	1:2000	

Tabelle B-1. Auflistung der für die Western Blot Analysen verwendeten primären und sekundären Antikörper

B.3.3.5 Quantifizierung der Pr55^{gag} Konzentration im ELISA

Zur Quantifizierung der Pr55^{gag} Konzentration in Zellysaten und Zellkulturüberständen wurden 96-well MaxiSorb-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100µl einer 1:300 Verdünnung des p24-spezifischen Antikörpers M01 in 0.1M Karbonatpuffer (pH 9.5) über Nacht (4°C) beschichtet. Anschließend wurden die Zellysate sowie der Pr55^{gag}-Standard seriell (50-0 ng/ml) in Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA) verdünnt und je 100µl der Verdünnungen, nach mehrmaligem Waschen (3x) der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween-20), zugegeben und 1h (37°C) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (6x) wurden je 50µl einer 1:5000 Verdünnung des zweiten, biotinylierten p24-spezifischen Antikörpers

37G12 in Verdünnungspuffer zugegeben und eine weitere Stunde (RT) inkubiert. An weitere Waschschritte (10x) anschließend wurden 100µl einer 1:10000 Verdünnung des Streptavidin-HRP Konjugats (Roche, Mannheim) zugefügt. Nach einer Inkubation von 30min (RT) wurde die Mikrotiterplatte abermals gewaschen (10x). Die Antikörper-Antigen Komplexe wurden unter Verwendung von je 100µl TMB-Substratlösung nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg) detektiert. Die Adsorption wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt. Mit Hilfe der Pr55^{gag}-Eichgeraden wurden anschließend die Mengen Pr55^{gag} pro µg Gesamtproteinmenge bestimmt. Die für diesen ELISA verwendeten p24-spezifischen Antikörper M01 und 37G12 (biotinyliert) wurden von PolyImmuno (Wien, Österreich) bezogen.

B.3.3.6 Immunpräzipitation transient exprimierter Proteine

Zur Anreicherung transient exprimierter, löslicher Proteine aus Zellysaten und Überständen, wurden zunächst die jeweiligen Verdünnungen (1:100-1:500) der primären Antikörper in 1ml eines Dreifach-Detergenz Lysepuffers (50mM Tris-HCl pH8.0; 150mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% Nonidet-40 (w/v); 0,5% Na-Deoxycholat (w/v)), der zuvor mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail, Complete™ (Roche, Mannheim) versetzt wurde, an je 30mg ProteinA-Agarose (SIGMA, München) 3h (4°C) im Überkopfschüttler gekoppelt. Anschließend wurden die Komplexe 3x mit Lysepuffer gewaschen (9000rpm, 5min, 4°C). Pro Probe aufgereinigter Zellysate bzw. Zellkulturüberstand wurden je 100µl (=3mg ProteinsA-Antikörper Komplex) zugegeben und ÜN (4°C) im Überkopfschüttler inkubiert. Die Immunkomplexe wurden daraufhin mind. 6x mit Lysepuffer gewaschen und anschließend in 50µl 1x SDS-Probenpuffer (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 0.5mM EDTA, 0.005% Bromphenolblau) aufgenommen und 5-10min bei 100°C aufgekocht. Je 25-50µl der Probe wurde anschließend im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse analysiert.

B.3.3.7 „Luziferase Reporter Assay“: Quantifizierung der Luziferase Aktivität in den Zellysaten

Für den „Framshift“-Assay, sowie zur Analyse der Effizienz unterschiedlicher Promotor/Enhancer Elemente und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit den an den jeweiligen Stellen angegebenen Luziferase-Reporter Konstrukten (pGL₂) in 6-well Kulturschalen transfiziert und 36h nach der Transfektion in 100µl 1x CCLR nach Angaben des Herstellers lysiert (Promega, Mannheim). Die Luziferase Aktivität (RLU; „relative light units“) wurde über eine Zeitspanne von 10sek. aus 20µl der entsprechend verdünnten Zellysaten (1:10-1:10000) nach Zugabe von je 100µl Substrat nach Anweisung der Herstellerfirma im Luminometer gemessen und mit der Gesamtproteinmenge der einzelnen Proben verrechnet (RLU/µg Gesamtprotein).

B.3.3.8 „CAT Reporter Assay“: Quantifizierung der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Konzentration in den Zellysaten

Zur Bestimmung der Aktivität des viralen, regulatorischen Proteins Tat wurden humane H1299 Zellen mit je 7.5µg der entsprechenden Tat-Expressionsplasmiden und je 7.5µg des Reporterkonstrukts pLTR/CAT (Baldari und Telford *et al.*, 1992) in 6-well Kulturschalen ko-transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Konzentration von CAT im ELISA (unverdünnt-1:1000) nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) ermittelt und mit der Gesamtproteinmenge der jeweiligen Probe verrechnet (CAT/µg Gesamtprotein).

B.3.3.9 Indirekter Nachweis der Tat Expression mit Hilfe der Indikatorzelllinie Hela-LTR-βGal („MAGI-Assay“)

Für die Analyse der Aktivität des regulatorischen Proteins Tat wurde die CD4-positive Indikatorzelllinie Hela-LTR-βGal mit 45µg der entsprechenden Tat-Expressionsplasmide transfiziert. Nach 36h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5min (RT) fixiert (1% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd). Die Blaufärbung der Zellkerne, als Indikator der Tat Aktivität (MAGI, „*multi-nuclear*“)

activation of β -galactosidase induction“), wurde nach einer Inkubation von 3h in einer β -Galaktosidase Substratlösung (4mM Ferricyanid, 4mM Ferrocyanid; 2mM $MgCl_2$, 10% Dimethylsulfoxid, 0,4mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) in PBS) durch mehrmaliges Waschen mit PBS abgestoppt, und anschließend unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops (Leika, DMR) aufgenommen.

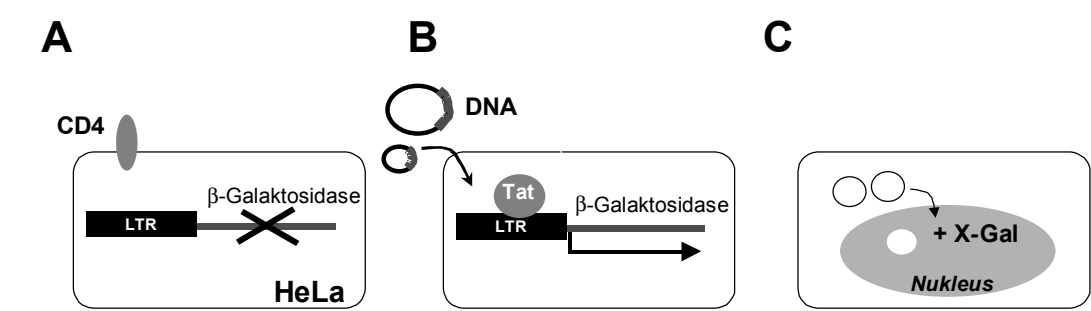


Abbildung B-1 Schematische Darstellung des MAGI-Assays (**A**) Die CD4-positive HeLa Zelllinie trägt eine ebenfalls in das Genom der Zelle integrierte Kopie des β -Galaktosidase Gens unter der Kontrolle des HI-viralen LTR-Promotors, der zunächst inaktiv ist. (**B**) Nach Transfektion der Zellen mit einem, für das virale Regulatorprotein Tat kodierendem Expressionplasmids, wird der LTR-Promotor aktiviert und die β -Galaktosidase exprimiert. (**C**) Die β -Galaktosidase trägt zudem eine artifizielle Kernlokalisierungssequenz (NLS), so daß nach Zugabe einer Substratlösung die Tat-exprimierenden Zellen an einer intensiven Blaufärbung der Zellkerne zu erkennen sind.

B.3.3.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen direkt auf sterile Deckgläschen in 6-well Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend transfiziert. Für die Immunfluoreszenz wurde nach 24-36h Stunden der Zellrasen mehrmals mit PBS gewaschen, und die Zellen anschließend auf dem Deckgläschen mit je 500 μ l einer 2% Paraformaldehyd (PFA)/PBS -Lösung fixiert (10min, RT) bzw. die Zellen nachfolgend mit 0,5% TritonX-100/PBS permeabilisiert (15min, RT). Nach einer terminalen Fixierung mit 4% PFA/PBS (10min,RT) und 2-maligem Waschen mit PBS wurden die jeweiligen Proteine spezifisch mit Hilfe geeigneter Primärantikörper (vgl. Tab. B-2), welche in Verdünnungspuffer (PBS/1% BSA/1% TritonX-100) verdünnt wurden, detektiert (1h, 37°C).

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung
PRIMÄRE ANTIKÖRPER			
13/5	Wolf et al., 1990	unverdünnt	murin, monoklonal p24/55 _{III} B
16/4/2	Wolf et al., 1990	1:1000	murin, monoklonal p24/55 _{III} B
ID9D5	MRC: EVA3021	1:500	murin, monoklonal Tat _{III} B (aa. 1-20)
NT3 2D1 1	MRC: ARP352	1:500	murin, monoklonal Tat _{III} B (aa. 72-81)
JLT-12	SIGMA, Deisenhofen	1:100	murin, monoklonal TroponinT
H-70	Santa Cruz, Heidelberg	1:200	Kaninchen, polyklonal Calnexin
SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER			
α -Maus-FITC	Dianova, Hamburg	1:200	FITC-konjugiert (Exc ₄₉₀ /Em ₅₂₅)
α -rabbit-Cy3	SIGMA, Deisenhofen	1:200	Cy3-konjugiert (Exc ₅₇₅ /Em ₆₀₅)

Tabelle B-2 Auflistung der für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten primären und mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten sekundären Antikörper.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit Hilfe von an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Sekundärantikörpern (vgl. Tab. B-2) in Verdünnungspuffer angefärbt. Durch die Zugabe von DAPI (1:1000, Exc₃₅₉/Em₄₆₁) (Roche, Mannheim) wurden zusätzlich die Zellkerne unspezifisch gefärbt. Nach einer Inkubation von 1h (37°C, lichtgeschützt) wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und mit dem Zellrasen nach unten luftblasenfrei mit 20-50µl Eindeckelmedium (24% (w/v) Glycerin, 9,6% (w/v) Polyvinylalkohol, 2,5% (w/v) DABCO, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) auf Objektträger aufgelegt und getrocknet (4°C, lichtgeschützt). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung der für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff entsprechender Anregungs,- und Sperrfilter an einem LEICA-DMR Mikroskop durchgeführt (Vergrößerung: 40x–100x) und mit Hilfe der Meta-View-Software bearbeitet.

Zum Nachweis des autofluoreszierenden (Exc₄₇₁/Em₅₀₃) 28 KDa Proteins GFP („green fluorescence proteine“) bzw. der GFP-Fusionsproteine (z.B. Rev-GFP) wurden die Zellen wie beschrieben transfiziert, mit PFA fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden zur Anfärbung der Zellkerne ein 30min Inkubationsschritt (37°C) in PBS/1%BSA/DAPI (1:1000) durchgeführt und die Objektträger wie beschrieben für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert.

B.3.3.11 Analyse der Proteinexpression durch *in vivo* Markierung mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin

Zur ko-translationalen, radioaktiven Markierung exprimierter Proteine mit [³⁵S]-Methionin, wurden die Zellen zunächst in 6-well Zellkulturschalen ausgesät und transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und der Anteil intrazellulären Methionins durch eine Kultivierung (1h) der Zellen in DMEM-„high glucose“-Medium, supplementiert mit 10% Hitze-inaktiviertem, dialysiertem FCS, L-Glutamin (580mg/l), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) depletiert. Anschließend wurden die Proteine durch die Zugabe von je 50µCi/ml mit „Redivue“-[³⁵S]-Methionin (Amersham, Braunschweig) 4h (37°C/5% CO₂) radioaktiv markiert. In einigen Versuchsansätzen wurde die Proteinsekretion durch die zusätzliche Zugabe von 10µg/ml Brefeldin A (SIGMA, Deisenhofen) inhibiert. Anschließend wurden die zu analysierenden Proteine spezifisch aus dem Überstand (500µl) bzw. den aufgearbeiteten Zellysaten immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde daraufhin 10min in Fixierungslösung (50% MeOH/10% HAc) inkubiert und unter Vakuum (2h, 70°C) auf Whatmann-3MM® Papier getrocknet. Die Proteine wurden anschließend autoradiographisch detektiert (KODAK BIOMAX-MS, 1-3 Tage).

B.3.3.12 „Pulse-Chase“ Markierung: Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) exprimierter Proteine *in vivo*

Zur Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) von Pr55^{gag} bzw. p24 *in vivo* wurden die Zellen zunächst - wie beschrieben- in Petrischalen transfiziert. Nach einer Inkubation von ca. 36h wurde der Zellrasen mehrmals gewaschen und die Zellen zur Depletion des intrazellulären Gehalts an Methionin mit je 5ml „Short-Term-Labeling“ Medium (DMEM-„high glucose“-Medium ohne Methionin, supplementiert mit 2mM L-Glutamin, 10% dialysiertem FCS und Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml)) 45min kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen 1ml mit 100µCi-radioaktivem [³⁵S]-Methionin (Amersham, Braunschweig) versetztem „Short-Term-Labeling“-Medium ausgetauscht und für weitere 15min bei 37°C inkubiert („Pulse“). Anschließend wurde der Zellrasen mehrmals mit PBS gewaschen und die Zellen nach Zugabe von 100µg/ml des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid (Calbiochem, Schwalbach) in 10ml DMEM-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert („Chase“). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellysate (1ml) präpariert und die bis zu diesem Zeitpunkt intrazellulär vorhandenen Proteine immunpräzipitiert und elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 10min in Fixierungslösung (50% MeOH/10% HAc) inkubiert, unter Vakuum getrocknet (2h, 70°C) und die radioaktiven Proteine durch Auflegen eines X-OMAT Films bzw. BIOMAX-MS Films (Kodak) für 24-72h autoradiographisch detektiert. Die Abnahme der Bandenstärke über die Zeit wurde mit Hilfe der „Molecular Analyst“ Software (Bio-Rad, München) ausgewertet.

B.3.4 Analyse des RNA-Exports: Isolierung und Nachweis spezifischer RNA-Transkripte (Northern Blot)

B.3.4.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden beim Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen sowie sterile Plastikpipetten verwendet. Alle Apparaturen und Gefäße wurden zuvor mit 0.2M NaOH gründlich gereinigt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H₂O_{bid.} hergestellt und durch Filtration oder Autoklavierung sterilisiert. Dazu wurden 1ml/l DEPC (SIGMA, Deisenhofen) zugegeben, mind. 12h inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der kanzerogenen Chemikalie autoklaviert. Die meisten Arbeitsschritte, insbesondere die Gelelektrophorese, wurde aus Sicherheitsgründen unter der Abzugshaube durchgeführt.

B.3.4.2 Zellfraktionierung und Aufreinigung der RNA

Zur Isolierung und Analyse spezifischer mRNAs wurden die Zellen zunächst in Petrischalen ausgesät und transfiziert. Nach 36h wurden der Zellrase 2x mit PBS gewaschen, in 3ml Trypsin-EDTA (Life-Technologie, Karlsruhe) abgelöst und nach Zugabe von 5ml FCS abzentrifugiert (300xg, 5min, 4°C). Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 175µl RLN-Lysepuffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0; 140mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,5% NP-40) partiell lysiert und die lösliche, zytoplasmatische Fraktion wurde durch anschließende Zentrifugation (300xg, 2min, 4°C) von der unlöslichen, nukleären Fraktion abgetrennt. Die pelletierten Zellkerne wurden nachfolgend durch Zugabe von 350µl RLT Puffer vollständig lysiert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus der zytoplasmatischen (C) bzw. nukleoplasmatischen (N) Fraktion wurde unter Verwendung des „RNeasy-Mini Kits“ (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die präparierte RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser (30-50µl) aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung des Adsorptionspektrums (230nm-300nm) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($RNA [\mu g/\mu l] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 \times 10^{-3}$) ermittelt.

B.3.4.3 Herstellung und Aufreinigung radioaktiver RNA-Sonden

Radioaktive „antisense“ RNA-Sonden wurden mittels dem „T7- bzw. Sp6-Riboprobe in vitro Transcription Systems“ (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers generiert, wobei durch eine *in vitro* Transkription (1h, 37°C) statistisch [³²P]-α-CTP (50µCi/Reaktion) (Amersham, Braunschweig) in die RNA-Sonde eingebaut wurde. Als Transkriptionsmatrize wurden jeweils 500ng linearisierte, gelelektrophoretisch aufgetrennte und gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt (vgl. Tab. B-3).

Sonde	Plasmid	Enzym	~ Länge [nt]	Promotor
wt-Gag	pc-wtgag	<i>Bgl II</i>	270	Sp6-vermittelte Transkription
syn-Gag	pc-syngag	<i>Bgl II</i>	270	Sp6-vermittelte Transkription
RRE	pcR-ERR	<i>Xho I</i>	850	T7-vermittelte Transkription
wt-Tat	pc-wttat	<i>Eag I</i>	260	Sp6-vermittelte Transkription
syn-Tat	pc-syntat	<i>EcoR I</i>	260	Sp6-vermittelte Transkription
scra-Tat	pc-scratat	<i>EcoR I</i>	500	Sp6-vermittelte Transkription
Neomycin	pcR-Neo'	<i>EcoR I</i>	300	T7-vermittelte Transkription
β-Aktin	pGEM ₃ -Aktin	<i>Eco RI</i>	1200	Sp6-vermittelte Transkription

Tabelle B-3 Auflistung der für die Herstellung der radioaktiver RNA-Sonden verwendeten DNA-Plasmide, der Restriktionsenzyme sowie des jeweiligen, verwendeten Promotors für die *in vitro* Transkription. Ebenfalls angegeben ist die maximale Länge der jeweiligen synthetisierten, radioaktiven RNA-Sonde.

Die Reinigung der radioaktiv markierten RNA-Sonden erfolgte über Centriscin-20 Säulen (Princeton, Separations). Dazu wurden die Säulen für mind. 30min (RT) mit 650µl H₂O inkubiert, überschüssige Flüssigkeit abzentrifugiert (2700rpm, 2min) und die radioaktiv markierte RNA-Sonde nach Zugabe des *in vitro* Transkriptionsansatzes durch Zentrifugation (2700rpm, 2min) in ein Auffanggefäß eluiert.

B.3.4.4 Analyse der RNA: Northern Blot

Gleiche Mengen der aus den Zellen isolierten und gereinigten RNA (5-20µg) wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20µl gebracht, mit 5x RNA-Probenaufragspuffer (4mM EDTA, 4x MOPS-Laufpuffer, 0.9M Formaldehyd, 20% Glycerin, 30% Formamid, 0.2% Bromphenolblau, 0.2% Xylencyanol) versetzt, aufgekocht (55°C, 15min) und 3min auf Eis (4°C) inkubiert. Anschließend wurde die RNA in einem 1-1.5%igem Formaldehydgel (1-1.5% Agarose, 1x MOPS-Laufpuffer, 6,5% Formaldehyd, pH 7.0) in 1x MOPS Laufpuffer (0.4M MOPS, 10mM EDTA, 0.1M NaAc, pH 7.0) elektrophoretisch aufgetrennt (100V, 2-3h). Als Standard wurde ebenfalls 2µl eines 0.2-10kB RNA-Markers (SIGMA, Deisenhofen) aufgetragen. Das Gel wurde darauffolgend 3x 15min mit DEPC-Wasser gewaschen und 45min mit 20x SSC-Puffer (3M NaCl, 0.3M Na₃-Citrat, pH 7.0) inkubiert. Die Übertragung der RNA auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Biodyne Plus; Pall, Dreieich) erfolgte ÜN (16-20h) mittels Kapillarkraft („Northern Blot“). Als Transferpuffer wurde 20X SSC-Puffer verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran 5min mit 5x SSC-Puffer gewaschen, an der Luft getrocknet (10min) und die RNA durch UV-Behandlung (1200kj, 1min) im Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert („cross-linking“). Die ribosomale RNA wurde anschließend unspezifisch und reversibel mit 0,03% Methylenblau/0,03% NaAc angefärbt und der Kontrast mit H₂O_{bid.} verschärft. Anschließend wurde der RNA-Standard angezeichnet, sowie die Laufhöhe der 5S (< 0.2 kb), 18S (1.9kb) und 28S rRNA (4.7-5.0 kb) markiert und die Membran für die interne Kontrolle fotografiert. Zur Detektion spezifischer RNAs wurde die Membran zunächst 5min in 5x SSPE-Puffer (20x SSPE: 3M NaCl, 0.2M NaH₂PO₄ x H₂O, 20mM EDTA, pH 7.4) inkubiert und anschließend in speziellen Hybridisierungsgefäßen (Biotetra, Göttingen) in 10ml Hybridisierungspuffer (5x SSPE, 5x Denhardts Reagenz (100x: 1% Ficoll-400, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA), 0.1% SDS, 50% Formamid, 0.4mg/ml tRNA (Roche, Mannheim)) für 2-3h bei 65°C im Überkopfschüttler prä-inkubiert. Nach Zugabe von 0,2-0,5µl/ml der jeweiligen radioaktiv-markierten RNA Sonde (= ca. 1-5x10⁶ cpm/ml) wurde die Membran des weiteren ÜN (65°C) inkubiert. Die Membran wurde anschließend nach 2-3maligem Waschen für je 30min bei 65°C mit einem „High Stringency“-Waschpuffer (0.1x SSC/0.1% SDS) und einem finalem 10-minütigem Waschschrift mit H₂O (RT) in Klarsichtfolie eingeschweißt und die spezifische RNA nach einer Inkubation von mind. 24h (-80°C) autoradiographisch (KODAK Biomax MR, Amersham) detektiert und/oder durch Exposition einer Phosphor-Imager Platte mit Hilfe der „Molecular Analyst“ Software (Bio-Rad, München) ausgewertet.

B.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Herstellung stabiler, das Fusionsprotein Revgfp exprimierender Zelllinien wurden die jeweiligen Zellen in Petrischalen ausgesät und mit dem eukaryontischem Expressionsvektor pCsREVsg25GFP (Neumann M., GSF, München), welcher zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen (Neo^R) trägt, transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen 1:100-1:500 auf ca. fünf neue Petrischalen gesplittet und in Selektionsmedium (DMEM -Vollmedium, supplementiert mit 1mg/ml G418) 2-3 Wochen kultiviert. Dabei wurde alle 3 Tage das Selektionsmedium erneuert. Nach Absterben der nicht transfizierten und Neomycin-negativen Zellen innerhalb der ersten Woche, bilden sich im Verlauf der weiteren Kultivierung klonale, positive Zellkolonien. Diese wurden in Abhängigkeit des Zellwachstums nach etwa 2-3 Wochen mit Hilfe von „cloning cylinders“ (SIGMA, Deisenhofen) isoliert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, der sterile Zylinder über die Kolonie gesetzt, die einzelne Zellkolonie durch Zugabe von je 50µl Trypsin/EDTA abgelöst und in eine 6-well Zellkulturgefäß in 2ml Selektionsmedium überführt. Nach weiterer Expansion der Zellen wurde die Expression des Fusionsproteins Revgfp mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Positive Klone wurden erneut 1:500-1:1000 in Petrischalen ausgesät und einzelne Klone –wie bereits beschrieben- mit dem Zylinder isoliert, expandiert und die Revgfp Expression analysiert. Zur weiteren Aufreinigung stabiler Transfektanten wurden die einzelnen Zellpopulationen mit Hilfe des FACS-CellSorters (BD, Heidelberg) vereinzelt. Dazu wurden die Zellen geerntet, 1x mit PBS/1%FCS und 1x mit PBS gewaschen, die Zellkonzentration auf 5 x10⁵ Z/ml eingestellt und Zellaggregate durch Filtration durch ein 70µm Nylonfilter (BD, Heidelberg) getrennt. Anschließend wurden die Zellen anhand ihrer Autofluoreszenz

im *CellSorter* isoliert und je 1×10^3 Zellen in eine Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte, in der $100 \mu\text{l}$ Selektionsmedium vorgelegt worden war, automatisch pipettiert. Nach Expansion der Zellen wurde die Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie die GFP Fluoreszenz durch FACS-Analyse analysiert.

B.5 Analyse der Proteinexpression durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation

Zur Analyse der von post-transkriptionellen Prozessen, wie z.B. dem RNA-Export, unabhängigen Proteinexpression, wurde die Synthese des Proteins durch eine gekoppelte T7-abhängige *in vitro* Transkription und Translation unter Verwendung des „TNT[®]-Coupled-Reticulocyte Lysate“-Assays (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers überprüft. Hierfür wurden pro Ansatz 500ng des jeweiligen Expressionskonstrukts in eine $25 \mu\text{l}$ -Reaktion eingesetzt und 1h bei 30°C inkubiert. Durch den ko-translationalen Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure „Redivue“- ^{35}S -Methionin bzw. ^{35}S -Cystein (Amersham, Braunschweig) konnte die Proteinbiosynthese, nach Auftrennung Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Gel Trocknung unter Vakuum (2h, 70°C) autoradiographisch (KODAK, BIOMAX-MS, Amersham) nachgewiesen und analysiert werden.

B.6 Das Baculovirus Expression System: Aufreinigung Virus-ähnlicher Gag Partikel (VLPs) und löslicher Gag Proteine

Baculoviren („*baculiform*“; engl. stabförmig) sind stäbchenförmige, von einer Hüllmembran umgebene dsDNA Viren, die sich nur in wenigen, nah verwandten Insektenspezies vermehren können. Für das rekombinante Expressionssystem werden hauptsächlich zwei Viren verwendet: AcMNPV (*Autographia californica nuclear polyhedrosis virus*) und BmNPV (*Bombxy mori nuclear polyhedrosis*). Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren, wird das entsprechende Gen in einen Transfervektor kloniert und zusammen mit der linearisierten Virus-DNA in Insektenzellen ko-transfiziert. Durch homologe Rekombination entstehen so rekombinante Baculoviren, die klonal expandiert und mittels PCR oder Western Blot analysiert bzw. detektiert werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten, rekombinanten Baculoviren (Wildtyp: AcMNPV), exprimieren zusätzlich zu den viralen Proteinen, das HI-virale Strukturprotein Pr55^{gag} (**AcB1**) bzw. ein Pr55^{gag} Protein, welches C-terminal um die V3/IIIB-Sequenz des HI-viralen Hüllproteins gp120 verlängert ist (**AcB4**) (Wagner *et al*, 1994). Beide für Pr55^{gag} bzw. Pr55^{gag}V3 kodierenden Gene sind an der Position des viralen Polyhedrin-Gens unter Kontrolle des entsprechenden p10 Promotors in das Genom inseriert, dessen Expression erst sehr spät während der viralen Replikation aktiviert wird. Nach Infektion von Insektenzellen mit den rekombinanten Baculoviren wird das 55kDa-Protein exprimiert und in Form von Virus-ähnlichen Partikel (VLPs) in den Überstand freigesetzt.

B.6.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

B.6.1.1 Kultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung der semiadhärenten Insektenzelllinie **SF-9** (*Spodoptera frugiperda*, ATCC CRL 1711) erfolgte sowohl in 75cm^2 -Zellkulturflaschen (BD, Heidelberg) als auch als Suspensionskultur in Rührkulturflaschen („Spinnerkultur“, 50-60rpm) in TC-100 Medium mit D-Glukose ($4,5\text{mg/ml}$), 1mM Natriumpyruvat, welches mit 2mM L-Glutamin, 10% inaktiviertem FCS, Kanamycin ($50\mu\text{g/ml}$) und 2% Pluronsäure F-68 supplementiert wurde. Die semiadhärenten **HighFive[™]-Zellen H5** (*Trichoplusia ni*; Invitrogen, Groningen, NL) wurden in 75cm^2 -Zellkulturflaschen mit serumfreiem „Express-Five-SFM“ Medium, welches mit 2mM L-Glutamin (Pan Systems,), Kanamycin ($50\mu\text{g/ml}$) und 2% Pluronsäure F-68 supplementiert wurde, kultiviert. Die Insektenzellen wurden generell bei 26°C ohne zusätzliche CO_2 -Begasung im Brutschrank gezogen und nach Erreichen der Konfluenz 1:3-1:5 (Spinnerkultur: 2×10^5 - 1×10^6

Z/ml) subkultiviert. Sämtliche Zellkulturprodukte wurden -wenn nicht anders vermerkt- von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Die SF-9 Zellen wurden hauptsächlich zur Amplifikation rekombinanter Baculoviren, die H5 Zellen ausschließlich zur Produktion der in den Überstand freigesetzten Pr55^{gag}-VLPs verwendet.

B.6.1.2 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Zur Amplifikation der Viren wurden die SF-9 Insektenzellen in einer Spinnerkultur (5×10^5 - 3×10^6 Z/ml) expandiert, je 1 - 1.5×10^7 Zellen in 75cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und, nach Absetzen der Zellen den etwa 70% konfluenten Zellrasen mit je $500\mu\text{l}$ eines titrierten Virusstocks ($\sim 10^7$ Viren/ml; 1 MOI „multiplicity of infection“) in einem Gesamtvolumen von 3ml serumfreiem TC-100 Medium unter leichtem Schwenken infiziert. Nach 30-45min wurden 20ml TC-100 Vollmedium zugegeben und die infizierten Zellen weitere 6-7 Tage im Brutschrank (26°C) kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und durch 2-malige Zentrifugation ($300\times g$, 10min; $1200\times g$ 20min) von Zellen und Zelltrümmer befreit. Die Titration des Virusstocks (pfu/ml) erfolgte nach der Methode von Volkmann und Summers, 1975. Die auf diese Weise in großen Mengen hergestellten Virusstocks wurden bei 4°C gelagert.

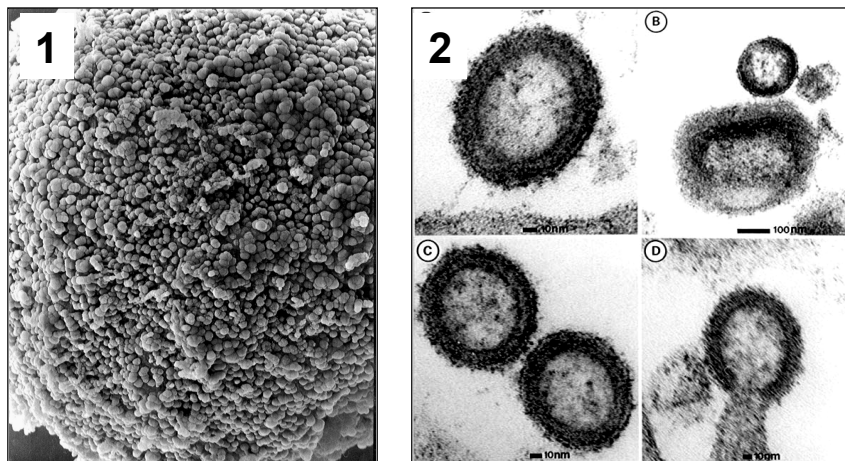


Abbildung B-2 Ausknospfung Pr55^{gag}-Virus-ähnlicher Partikel aus mit rekombinanten Baculoviren infizierten SF-9 Insektenzellen. (1) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der zellulären Oberfläche Baculo-Virus produzierender SF-9 Zellen und den ausknospenden Pr55^{gag}-Partikel (Notka F., Dissertation 1998; IMMh) (2) Elektronenmikroskopische Aufnahme (D) eines knospenden Partikels bzw. bereits freigesetzter (A,C) komplett bzw. (B) partiell von Lipidmembran umhüllten Virus-ähnlichen Partikeln (modifiziert nach Wagner et al., 1994).

B.6.2 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

B.6.2.1 Produktion und Aufreinigung der Gag Partikel (VLPs)

Zur Produktion und Aufreinigung von Pr55^{gag} VLPs wurden die serum-frei wachsenden High-FiveTM Zellen in 75cm^2 -Kulturflaschen expandiert, ausgesät und der etwa 70% konfluente Zellrasen, nach Absetzen der Zellen, mit rekombinanten Baculoviren -wie bereits beschrieben wurde- infiziert (vgl. B.6.1.2). Die Zellkulturüberstände wurden allerdings bereits ca. 3-4 Tage nach Infektion geerntet und vereint. Je 30ml der durch Zentrifugation vorgereinigten Überstände (vgl. B.6.1.2) wurden durch ein Kissen von 5ml Saccharose in PBS (30% (w/v)) $2\frac{1}{2}$ h bei 16°C und 28.000rpm ($120.000\times g$) zentrifugiert und das Pellet in $200\mu\text{l}$ PBS über Nacht aufgenommen. Zur Charakterisierung wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt und die Aufreinigung nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben (1 - $5\mu\text{l}$) mittels Coomassie Färbung (vgl. Abb B-3, A) bzw. mittels konventionellem Western Blot Verfahren analysiert. Für in

in vivo Anwendungen, sowie zur *in vitro* Restimulation von Milzzellpopulationen, wurden die VLPs durch UV-Bestrahlung (1h) sterilisiert, aliquotiert und bis auf weiteres bei -80°C gelagert.

B.6.2.2 Aufreinigung löslicher Gag Proteine aus Pr55^{gag}-VLPs mittels präparativer Gelelektrophorese (PrepCell®)

Die Aufreinigung des löslichen, HI-viralen 55kDa Gag Proteins aus den aufgereinigten Pr55^{gag}-Lipidpartikeln (VLPs) erfolgte mittels einer präparativen Gelelektrophorese unter Verwendung der PrepCell® Apparatur (Bio-Rad, München). Nach den Angaben des Herstellers wurden je 3mg der aufgereinigten Partikel (vgl. B.6.2.1) mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 10min bei 95°C aufgekocht, im Ultraschallbad sonifiziert und je 3ml Volumen über ein zylindrisches SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Stromstärke: 40mA). Nach einem 2-stündigem Vorlauf mit 1x Auftragspuffer (ohne Probe) wurden die Probe aufgetragen, und nach $2\frac{1}{2}\text{h}$ etwa 4ml-Fractionen des anschließenden Durchlaufs (10-12h) mit Hilfe eines automatisierten Kollektors gesammelt. Jede zweite Fraktion wurde anschließend analysiert. Dazu wurden die Proteine von je 250 μl der entsprechenden Fraktion mittels der NaDoc/TCA-Methode gefällt (vgl. B.3.3.3.3), gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels detektiert (vgl. Abb. B-3, B). Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an 55kDa Gag Protein wurden anschließend vereinigt, nochmals gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie Färbung des Polyacrylamidgels sowie mittels Western Blot Analyse mit Hilfe p24-spezifischer Antikörper charakterisiert und nach Bestimmung der Gesamtproteinmenge bis zur weiteren Verwendung in 500 μl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

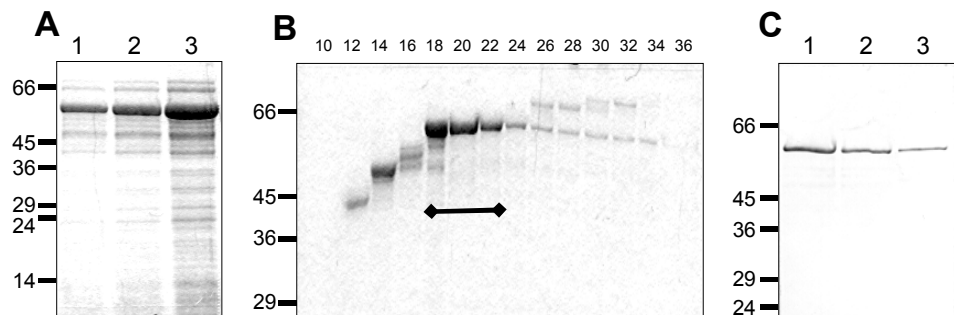


Abbildung B-3 Aufreinigung partikulärer, Virus-ähnlicher Gag Partikel sowie lösliches 55kDa Gag Protein mit Hilfe des Baculovirus Expression systems. **(A)** Die Partikel wurden 72h nach Infektion HighFive™-Zellen mit rekombinanten Baculoviren aus dem Zellkulturüberstand mittels Ultrazentrifugation durch ein 30%-iges Saccharosekissen pelletiert und 1 μl (Spur 1), 2 μl (Spur 2) und 5 μl (Spur 3) in einem 12.5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt (Coomassie-Färbung). **(B)** Die Proteinkomponenten von je 3mg der Partikel wurden durch eine präparative Gelelektrophorese (PrepCell®, Bio-Rad) voneinander getrennt, und in Fraktionen (#10-38) gesammelt. Die Proteine von je 250 μl jeder zweiten Fraktion wurden gefällt, über eine 12.5%-iges SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. **(C)** Die Fraktionen #17-22 wurden anschließend vereinigt und je 10 μl (Spur 1), 5 μl (Spur 2) und 2 μl (Spur 3) elektrophoretisch (12.4% SDS-PAGE) aufgetrennt und die Aufreinigung mittels Coomassie-Färbung (nicht gezeigt) bzw. im Western Blot mit Hilfe des p24-spezifische Antikörper 16/4/2 detektiert und überprüft.

B.7 Immunisierung der Versuchstiere und allgemeine immunologische Arbeitstechniken

B.7.1 Immunisierung der Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden ausschließlich weibliche Mäuse der Albino-Inzuchtrasse Balb/cAnCrIBR (H-2^d), die im Alter von 44-45 Tage von Charles River

(Sulzfeld) bezogen wurden, verwendet. Die Tiere wurden unter keimfreien Bedingungen, in der Tierzuchtanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten.

B.7.1.1 Präparation semi-steriler Endotoxin-freier Plasmid-DNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), wurde die bakterielle Plasmid-DNA für die *in vivo* Studien im Mega,- bzw Giga-Maßstab unter Verwendung des „Endotoxin-free DNA preparations“-Kits nach Angaben des Herstellers präpariert (Quiagen, Hilden) und in einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in sterilem PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen) aufgenommen. Der Endotoxin-Gehalt wurde mit Hilfe des „Limulus Amebocyte“-Assays QCL-1000® (Biowhittaker, Walkersville, USA) bestimmt. Nach den allgemeinen Richtlinien wurden für die Immunisierungsstudien ausschließlich Plasmid-DNA verwendet, deren Endotoxin-Gehalt $< 0,5 \text{ EU/ml}$ ($1,8 \text{ EU/ml} = 1 \text{ ng LPS}$) war.

B.7.1.2 Immunisierung der Balb/c-Mäuse

Die Versuchstiere wurden i.d.R. im Alter von 8 Wochen, eine Woche nach Anlieferung, immunisiert. Zur **intramuskulären Immunisierung (i.m.)** wurden die Tiere zunächst mittels dem Inhalationsnarkotikums Metofane (Janssen GmbH, Neuss) betäubt und, nachdem die Einstichstelle rasiert wurde, je $50\mu\text{l}$ der entsprechend konzentrierten Plasmid DNA in PBS langsam in beide Schienbeinmuskel (*tibialis anterior*) injiziert. Partikuläre Lipoproteinpartikel (VLPs) wurden ebenso wie unter gegebenen Umständen auch Plasmid-DNA **subkutan (s.k.)**, durch Injektion der entsprechend, in $200\mu\text{l}$ PBS konzentrierten Lösung, am Schwanzansatz der Tiere, appliziert. Bei einer **intraperitonealen Immunisierung (i.p.)** wurde die jeweils angegebene Menge an Protein bzw. Peptid in einem Volumen von $300\text{--}500\mu\text{l}$ in den Bauchraum gespritzt. Für **intravenöse Applikationen (i.v.)** wurden je $100\text{--}200\mu\text{l}$ Injektionslösung in die durch Erwärmung (Rotlichtlampe, 10min) erweiterten Gefäße der lateralen Schwanzvene injiziert. **Intradermale Immunisierungen (i.d.)** des hinteren Fußballens („*footpad immunization*“) wurden durch Injektion von je $50\mu\text{l}$ der Lösung zwischen *Pulvini phalangici* und *Pulvini metatarsales* an mit Metofan betäubten Tieren durchgeführt. Für alle Injektionen wurden $27\text{-GX}^3/4$ ($0.4\times 19\text{mm}$) Kanülen und sterilen 1ml-Spritzen (BD, Heidelberg) verwendet. Nach der Grundimmunisierung wurden die Mäuse in der Regel nach 3 bzw. 6 Wochen erneut immunisiert (Auffrischimpfung; „Boost“-Immunisierung).

B.7.2 Analyse der humoralen Immunantwort

B.7.2.1 Gewinnung von Serum

Den immunisierten Tieren wurde in der Regel 7 Tage nach der Grundimmunisierung und 2 Wochen nach der ersten bzw. eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung durch Anritzen der Schwanzvene mit einem sterilem Skalpell Blut entnommen ($100\text{--}500\mu\text{l}$). Die Blutentnahme wurde dabei durch die Erwärmung der Mäuse mittels einer Rotlichtlampe (5-10min) erleichtert. Zur Serumgewinnung wurde das Blut 1h bei 37°C bzw. 1h bei 4°C (Agglutination der Blutzellen) inkubiert und der Überstand nach zweimaliger Zentrifugation (7000rpm , 4°C , 10min) als Serum gewonnen. Anschließend wurde das Serum für 30min bei 56°C inaktiviert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

B.7.2.2 Bestimmung der spezifischen Gesamt-Ig Antikörpertiter

Zur Bestimmung der absoluten Gag-spezifischen Ig Antikörper-Titer wurden mitteladsorbierenden 96-well Platten (Nunc, Wiesbaden) über Nacht (4°C) mit je 100ng PrepCell®-gereinigtem 55kDa Gag Protein in $100\mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ Karbonatpuffer (pH 9.5) beschichtet ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). Alternativ, wurden zur Bestimmung absoluter Tat-spezifischer AK-Titer 96-well MaxiSorb Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit 500ng rekombinantem Tat Protein (Aventis Pasteur, Paris, Frankreich) beschichtet ($5\mu\text{g}/\text{ml}$). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS/ $0,05\%$ Tween20) wurden die Platten mit je $200\mu\text{l}$ Blockierungslösung (PBS/ 10% FCS) pro Vertiefung 1h bei 37°C inkubiert. Die Seren der Versuchstiere wurden seriell in Verdünnungspuffer (PBS/ 2% FCS/ 3% Tween20) verdünnt (wahlweise: $1:80 - 1.310.720$). Je $100\mu\text{l}$ der

entsprechenden Verdünnung wurde anschließend in die Vertiefung pipettiert und 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 6x mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100µl einer 1:2000 in Verdünnungspuffer verdünnten anti-Maus Ig-HRP Antikörpers (Dako, Hamburg), 1h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem 6-maligem Waschen wurden je 100µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) zugegeben. Nach einer Farbentwicklung von ca. 15min bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion mit 50µl 1N H₂SO₄ abgestoppt und die jeweilige Adsorption bei einer Wellenlänge von 450nm (620nm) im Photometer gemessen. Der Antikörper-Titer des jeweiligen immunisierten Versuchstieres wurde als Endpunkt derjenigen reziproken Verdünnung definiert, deren O.D. um den dreifachen Wert eines parallel gemessener Wertes des Negativserums (z.B. nicht immunisierte Versuchstiere) derselben Verdünnung auf der gleichen Mikrotiterplatte gerade noch erhöht war.

B.7.2.3 Bestimmung der Antikörper-Isotypen

Neben der Bestimmung der absoluten Gag.-bzw. Tat-spezifischen Ig Antikörpertiter wurden parallel ebenfalls die Isotypen, IgG1 und IgG2a, der durch die Immunisierung induzierten Antikörper bestimmt. Anhand der Verhältnisse einzelner AK-Isotypen können im murinem System eindeutige Zuordnungen der CD4⁺ T-Zell vermittelten Immunantwort in Richtung T_H1 (IgG1 < IgG2a) bzw. T_H2 (IgG1 > IgG2a) Polarisierung getroffen werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden 96-well Mikrotiterplatten wie unter B.7.2.2. beschrieben mit Protein beschichtet und die seriellen Serumverdünnungen in die Vertiefungen pipettiert. Die Isotypen wurden durch Zugabe von je 100µl einer 1:2000 in Verdünnungspuffer verdünnten IgG1-HRP (BD, Heidelberg) bzw. IgG2a-HRP (BD, Heidelberg) Antikörperlösung detektiert. Das Protokoll wurde ansonsten wie unter B.7.2.2 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

B.7.3 Analyse der zellulären Immunantwort

B.7.3.1 Kultivierung primärer Splenozyten

Die Zellpopulation (Splenozyten), die aus der Milz immunisierter Mäuse präpariert wurde (~1-2x10⁸ Zellen/Milz), besteht zu einem großen Anteil an B-Lymphozyten (65%), CD4⁺ T-Zellen (20%), CD8⁺ T-Zellen (15%) sowie Monozyten/Makrophagen und dendritischer Zellen (10%). Die restlichen 5% der Zellen setzen sich aus neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten zusammen. Die isolierten Splenozyten wurden in RPMI-1640 Medium mit 2mM L-Glutamin, D-Glukose (4,5mg/ml), 1mM Natriumpyruvat, supplementiert mit 5% inaktiviertem FCS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml), 20mM HEPES und 50µM β-Mercaptoethanol bei einer Temperatur von 37°C und einer 5%-igen CO₂ Begasung im Brutschrank kultiviert. Da die primären Zellen ohne Zusatz von Zytokinen, wie z.B. IL-2, innerhalb von 2-3 Tage absterben, wurden alle Assays unverzüglich, direkt nach der Präparation der primären Zellen angesetzt.

B.7.3.2 Präparation der Milz und Isolierung der Splenozyten

Zur Entnahme der Milz wurden die Versuchstiere i.d.R. eine Woche nach der letzten Immunisierung durch CO₂-Begasung getötet, die Milzen unter Verwendung eines steriles Präparationsbestecks entnommen und die Organe einer Immunisierungsgruppe (5-10) in 10ml Vollmedium vereint. Anschließend wurden die Milzen mitsamt der Flüssigkeit in Petrischalen überführt, in kleinere Stücke geschnitten und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen mit dem Stempel einer 5ml-Spritze zerrieben. Nachfolgend wurden die Zellen durch einen sterilen 100µm-Nylofilter (BD, Heidelberg) in ein 50ml Gefäß gegeben und pelletiert (300xg, RT, 5min). Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurden die Zellen in 20ml ACK-Lysepuffer (150mM NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7.2) 5min (RT) inkubiert. Daraufhin wurden die Splenozyten durch drei wiederholte Waschschrte in je 50ml PBS/5% FCS gewaschen, anschließend in 20ml Kulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl (Z/ml) einer 1/50-1/100 Verdünnung durch Anfärbung mit Tryphanblau (0,4% Tryphanblau/PBS) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten.

B.7.3.3 Präparation von ConA-aktiviertem Zellkulturüberstand

Zur Herstellung von ConA-aktiviertem Zellkulturüberstand („Rattenfaktor“), welcher für die Bestimmung CD8⁺ zytotoxischer T-Zell Aktivitäten benötigt wird, wurden aus unbehandelten Ratten 30-50 Milzen entnommen und daraus –wie bereits für murine Milzen beschrieben– Einzelzellpopulation präpariert. Je 1×10^8 Zellen wurden anschließend in 50ml Kulturmedium aufgenommen (2×10^6 Z/ml) und in mittleren 75cm² Kulturflaschen, stehend zwei Tage mit 2µg/ml Concanavalin A (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Anschließend wurden die vereinigten Überstände zentrifugiert (2000rpm, 10min, 4°C), steril filtriert (0,22µm) und bis zur weiteren Verwendung in 25-50ml Aliquots bei –80°C gelagert.

B.7.3.4 *In vitro* Restimulation der Splenozyten: Quantifizierung der Zytokinsekretion (ELISA)

Je 2×10^6 Milzzellen (4×10^6 Z/ml) wurden in 24-well Zellkulturgefäße (Costar, Corning NY, USA) mit 500µl einer entsprechenden Verdünnung eines „Recall“-Antigens (VLPs (0.5-1µg/ml), rp24 (3µg/ml), rTat (0.25-0.5ng/ml), Peptide (10µM, 10µg/ml)) 24-48h *in vitro* restimuliert. Anschließend wurden die Überstände (1ml) abgenommen, durch Zentrifugation (600xg, 10min, 4°C) von Zellen und Zelltrümmern befreit und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der verschiedenen Zytokine (IFN-γ, IL-6, IL-12 (p70), IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, TNF-α) im Überstand von *in vitro* restimulierten Splenozyten wurde mit Hilfe kommerzieller Zytokin-ELISAs (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dabei meist unverdünnt bzw. bei Restimulation mit Pr55^{ag}-VLPs in einer Verdünnung von 1:10-1:100 vermessen.

B.7.3.5 ELISPOT-Assay: Quantifizierung Zytokin sezernierender Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl Zytokin sezernierender Zellen nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit spezifischen Recall-Antigenen wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-well Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100µl eines 5-10µg/ml in PBS verdünnten Anti-Zytokin Antikörpers (C, „capture“) (BD, Heidelberg) ÜN (4°C) inkubiert. Nach mehrmaligem, sterilem Waschen (4x) mit PBS/10% FCS wurde die Platte 1h bei 37°C mit 200µl PBS/10% FCS blockiert. Anschließend wurden je 100µl einer entsprechenden Verdünnung der Splenozyten (1×10^5 - 1×10^6 Zellen pro Ansatz) und je 100µl der stimulierenden Reagenz (10µM Peptid (2µg), 0,5-1µg rekombinantes Protein, 0,1-1µg PHA-P (10µg/ml) (Sigma, Deisenhofen) zugegeben und i.d.R. 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der *in vitro* Restimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen (6x) mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween20) lysiert. Anschließend wurden je 100µl einer auf 1µg/ml in Verdünnungspuffer (PBS/10% FCS/0,05% Tween20) verdünnten Lösung des sekundären, biotinylierten Zytokin-Antikörpers (D, „detection“) (BD, Heidelberg) zugegeben und weitere 2h bei RT inkubiert. Die Platte wurde gewaschen (10x) und die Antikörper-Antigen Komplexe durch Zugabe eines 1:5000 in Verdünnungspuffer verdünnten Streptavidin-AP Konjugats (Roche, Mannheim) detektiert. Nach einer Inkubation von 30min (RT) wurde die Platte wiederum gewaschen (10x). Anschließend wurde die Platte mit 50µl AP-Färbelösung nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) 15-30min inkubiert und die Spots (SFC; „spot forming cell“) nach wiederholtem Waschen mit H₂O und Trocknung (ÜN, RT) mit Hilfe eines automatisierten ELISPOT-Lesegerätes (BioSys) ausgezählt.

Zytokin	Antikörper-Pärchen	Klon	Konzentration	Verdünnung
IFN-γ	anti-Maus IFN-γ	C	R4-6A2	1mg/ml
	Biotin-anti-Maus IFN-γ	D	XMG1.2	0.5mg/ml
IL-4	anti-Maus IL-4	C	BVD4-1D11	0.5mg/ml
	Biotin-anti-Maus IL-4	D	BVD-24G2	0.5mg/ml

Tabelle B-5 Auflistung der für den ELISPOT-Assay verwendeten anti-Zytokin Antikörper Pärchen (BD, Heidelberg).

B.7.3.6 Bestimmung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort

Zur Bestimmung der zytotoxischen T-Zell Reaktivitäten (% Lyse) wurde die Lyse von Peptid-präsentierenden Zellen durch spezifisch gegen dieses Epitop *in vitro* restimulierten und spezifisch proliferierten T-Zellen mit Hilfe des radioaktiven Chrom-Freisetzungstests („*Chromium Release Assay*“) bestimmt. Die für diesen Assay verwendeten HIV-1 spezifischen, murinen MHC-Klasse I (H-2^d) restringierten Peptide (vgl. Tab. 6) wurden von der Firma Toplab (Martinsried) synthetisiert und HPLC gereinigt. Die lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-grade DMSO gelöst (10mM) und bei 4°C gelagert.

Die Peptide A9Ip^{24/1} (aa 197-205) und E10Fp^{24/2} (aa 291-300) sind als murine p24 ZTL-Epitope, des Haplotyps H-2^d beschrieben worden (Selby et al., 1997, Nakamura et al., 1997). Das Peptid R10I^{V3/IIIB} (gp160: aa. 318-327) stellt ein murines V3/IIIB-spezifisches ZTL-Epitop (Haplotyp H-2D^d) dar (Takahashi, et al. 1988; Sastry et al., 1992; Hanke, 1998, Nehete et al., 1995).

Bezeichnung	Sequenz	Haplotyp	MW [g/mol]	Konzentration	
A9Ip ^{24/1}	AMQMLKETI	H-2K ^d	1064,3	10mM	10,64 µg/µl
E10Fp ^{24/2}	EPFRDYVDRF	H-2L ^d	1343,5	10mM	13,4 µg/µl
R10I ^{V3/IIIB}	RGPGRAFTI	H-2D ^d	1073,3	10mM	10,7µg/µl

Tabelle B-6 Auflistung, Beschreibung und Konzentration der für den Zytotox-Assay verwendeten murinen ZTL-Peptide.

B.7.3.6.1 *In vitro* Restimulation Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Jeweils 3x10⁷ Splenozyten wurden entweder mit 1x10⁶ (30:1) bzw. 6x10⁶ (5:1) murinen (H-2^d) A-20 Stimulatorzellen in 10ml Kulturmedium mit 10% Rattenfaktor oder 15U/ml rIL-2 (Roche, Mannheim) für 5 Tage in aufrecht stehenden 25cm²-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) *in vitro* restimuliert. Die dafür benötigte Anzahl an A20-Zellen (5x10⁶/ml) wurde zuvor 1h (37°C, 5%CO₂) mit 10µM des jeweiligen MHC-Klasse I-restringierten Peptids „gepulst“ und anschließend nach dreimaligem Waschen (PBS/1%FCS) mittels eines Gammastrahlers mit 20.000rad (200Gy, ~2200 sek.) bestrahlt, um weitere Zellteilungen zu blockieren. Nach der 5-tägigen Inkubation wurde die Lebenszellzahl der Ansätze bestimmt, die Zellen pelletiert (300xg, 25°C, 5min) und in frischem Kulturmedium aufgenommen (1x 10⁷ Z/ml).

B.7.3.6.2 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest („⁵¹Cr-Release Assay“)

Zur Bestimmung der Antigen spezifischen Zytotoxizität der angereicherten CD8⁺ T-Lymphozyten wurden zunächst in 100µl unterschiedliche Zellzahlen (1x10⁶/5x10⁵/2.5x10⁵/1.25x10⁵ Zellen) in Triplets in 96-well Rundboden-Kulturplatten (BD, Heidelberg) vorgelegt (**Effektorzellen, E**). Anschließend wurden je 1x10⁴ mit Peptid gepulste, und mit ⁵¹Na-Chromat markierte, murine (H-2^d) P815 Zellen (**Zielzellen; „target cells“, T**) in 100µl (1x 10⁵ Z/ml) zugegeben und 3 1/2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurde die Lyse bei unterschiedlichen Verhältnisse der Effektorzellen und Zielzellen bestimmt (E:T z.B. 100:1/ 50:1/25:1/12.5:1).

Zuvor wurden je 1x10⁷ P815 Zielzellen entweder 1h mit 10µM Peptid in 1ml Medium „gepulst“ (P815/+) und anschließend oder direkt (P815/-) in 300µl FCS mit 250µCi ⁵¹NaOCr₂ (5mCi/ml; Amersham, Braunschweig) für 1 1/2 h bei 37°C markiert. Nach Entfernen der nicht eingebauten, radioaktiven Chrom-Verbindungen durch mehrmaliges Waschen mit PBS/2% FCS wurden die Zielzellen in Kulturmedium resuspendiert ausgezählt, die Konzentration auf 1x10⁵ Z/ml eingestellt und je 100µl zu je 100µl einer bestimmten Konzentration an Effektorzellen zugegeben und wie beschrieben inkubiert. Darüber hinaus wurde die spontane Freisetzung (1x10⁴ Zellen/100µl Medium) bzw. die maximale Freisetzung (1x10⁴ Zellen/100µl 5% Triton-X100) von elementarem ⁵¹Cr aus den P815-Zielzellen bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in einer Plattenzentrifuge abzentrifugiert (300xg, 3min) und je 50µl des Überstands in 96-well LumaPlate™-Platten (Packard, Meriden, USA) überführt. Nachdem die Platten über Nacht getrocknet wurden, wurde die Konzentration an ⁵¹Cr in einem Festphasen-γ-Szinillationsmeßgerät (Packard, Meriden, USA) bestimmt. Die spezifische Lyse [%] eines definierten E:T Verhältnisses als Maß für die ZTL-Reaktivität gegen ein spezifisches Peptid wurde nach der Formel: 100 x (gemessene ⁵¹Cr

Freisetzung – spontane ^{51}Cr Freisetzung) / (maximale ^{51}Cr Freisetzung – spontane ^{51}Cr Freisetzung) berechnet.

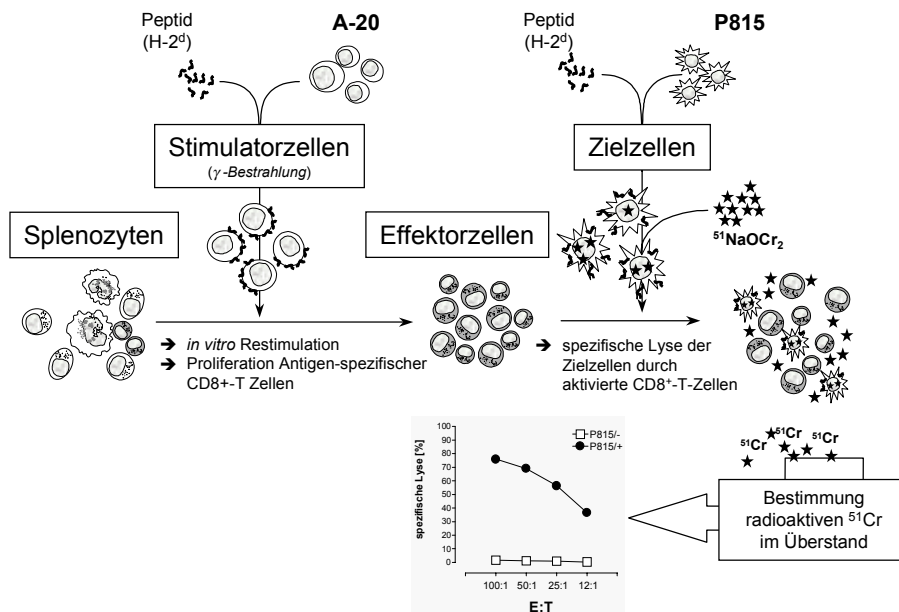


Abbildung B-4 Schematische Darstellung des ^{51}Cr -Zytotox-Assays. Die Stimulatorzellen A-20 werden mit einem ZTL-spezifischen Peptid „gepulst“, mit γ -Strahlen (20.000rad) bestrahlt und zur Stimulation und Proliferation spezifischer CD8^+ zytotoxischer T-Zellen zu einer heterogenen Splenozytenkultur immunisierter Mäuse gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Tagen werden die Zielzellen (P815) ebenfalls mit Peptid „gepulst“, mit $^{51}\text{NaOcr}_2$ markiert und zu unterschiedlichen Konzentrationen an Effektorzellen zugegeben. Durch eine ZTL-spezifische Lyse der Zielzellen wird ^{51}Cr in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Diese freigesetzte Radioaktivität wird anschließend im Szintillationsmeßgerät vermessen und daraus die spezifische Lyse [%] bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektor- und Zielzellen (E:T) berechnet.

B.7.4 Erfassung von immunogenen B,- und T-Zellepitopen

Sowohl die von B-Lymphozyten produzierten Antikörper als auch die T-Lymphozyten selbst erkennen lediglich bestimmte Bereiche eines Antigens. Zur Identifizierung dieser immunogenen B,- und T-Zell Epitope innerhalb des HI-viralen Tat Proteins wurden die Reaktivitäten der Antikörper bzw. der T-Zellen auf insgesamt acht sich überlappende, synthetische Peptide (20AS) des Tat Proteins (LAI) (MRC, EVA779.1-779.8) *in vitro* untersucht (vgl. Tab.). Die Aminosäuresequenz des Tat_{LAI} unterscheidet sich in lediglich drei Aminosäuren von dem für die Immunisierung verwendeten Tat_{HIB} Proteins.

B.7.4.1 Identifizierung muriner, Tat-spezifischer B-Zellepitope

Zur Identifizierung muriner, Tat-spezifischer B-Zellepitope wurden 96-well MaxiSorb Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit je $1\mu\text{g}$ Peptid in $100\mu\text{l}$ Karbonatpuffer (pH9.5) beschichtet ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) und die absoluten Ig-Antikörper der Seren einzelner Versuchstiere (Verdünnung 1:100 – 1:10.000), wie unter B.7.2.2 beschrieben durch Messung der $\text{O.D.}_{450\text{nm}}$ bestimmt. Diejenigen Peptide, die von den Serum-AK erkannt wurden, enthalten mit größter Wahrscheinlichkeit immunogene B-Zell Epitope.

B.7.4.2 Identifizierung muriner Tat-spezifischer T Zellepitope

Zur Identifizierung muriner, Tat spezifischer T-Zell Epitope wurde die Anzahl $\text{IFN-}\gamma$ sezernierender Zellen nach *in vitro* Stimulation der Splenozyten mit den entsprechenden Peptiden im ELISPOT-Assay (vgl. B.7.3.5) bestimmt. Diejenigen Peptide, die nach Stimulation die Sekretion von $\text{IFN-}\gamma$ induzieren, beinhalten mit größter Wahrscheinlichkeit immunogene, MHC-Klasse I und/oder MHC-Klasse II restringierte T-Zellepitope.

Bezeichnung	Aminosäureposition	Sequenz	Konzentration
Peptid 1	1-20	(M)EPVDPRLEPWKHPGSQPKTA	10mM
Peptid 2	11-30	KHPGSQPKTACTT(^N / _T)CYCKKCC	10mM
Peptid 3	21-40	CTT(^N / _T)CYCKKCCFHCQVCFT(^I / _T)TK	10mM
Peptid 4	31-50	FHCQVCFT(^I / _T)TKALGISYGRKK	10mM
Peptid 5	41-60	ALGISYGRKKRRQRRPPQ	10mM
Peptid 6	51-70	RRQRRPPQGSQTHQVLSK	10mM
Peptid 7	61-80	SQTHQVLSKQPTSQP(^S / _P)RGDP	10mM
Peptid 8	71-80	QPTSQP(^S / _P)RGDPTGPKE	10mM

Tabelle 7 Auflistung der für die Identifizierung von B,- und T-Zell Epitopen des HI-viralen Tat Proteins verwendeten, synthetischen überlappenden Peptide (*Tat_{LAI}*), die sich in der Sequenz in drei Aminosäuren von dem *Tat_{III}* unterscheidet: **(1)** Position 24: T (*Tat_{LAI}*) anstelle von N (*Tat_{III}*), **(2)** Position 39: T (*Tat_{LAI}*) anstelle von I (*Tat_{III}*) und **(3)** Position 77: P (*Tat_{LAI}*) anstelle von S (*Tat_{III}*).

C Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Promotion war die Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung geeigneter HIV-1 Vakzine Kandidaten auf der Basis eines DNA-Impfstoffes. Die detaillierte, molekularbiologische Charakterisierung der Expression verschiedenster, viraler Antigene *in vitro*, sowie die immunologische Evaluierung ausgewählter DNA-Vakzine Kandidaten im Balb/c Mausmodell *in vivo* waren hierbei Gegenstand dieser Arbeit.

C.1 Grundlegende Untersuchungen zur Expression des HI-viralen Strukturproteins Gag in Nagetierzellen

Die Expression des viralen, 55kDa Vorläuferproteins Pr55^{gag} (**wtgag**) in humanen Zellkultursystemen ist aufgrund der Anwesenheit cis-aktiver INS Elemente (vgl. A.2), welche indirekt den Export der pre-mRNA aufgrund einer frühzeitigen Degradation unterbindet, sehr ineffizient. Da es sich hierbei um ein spät exprimiertes, virales Gen handelt, ist die Expression des Polyproteins von der Anwesenheit des cis-ständigen, RNA-Exportsignals RRE und des viralen trans-ständigen Export Faktors Rev abhängig. Zudem scheint der 5' nicht translatierte Bereich UTR (5'-*untranslated region*), in dem u.a. der virale Hauptspleißdonor SD1 liegt, essentiell für die Rev-abhängige Expression von Pr55^{gag} zu sein (**UTR-wtgag-RRE**).

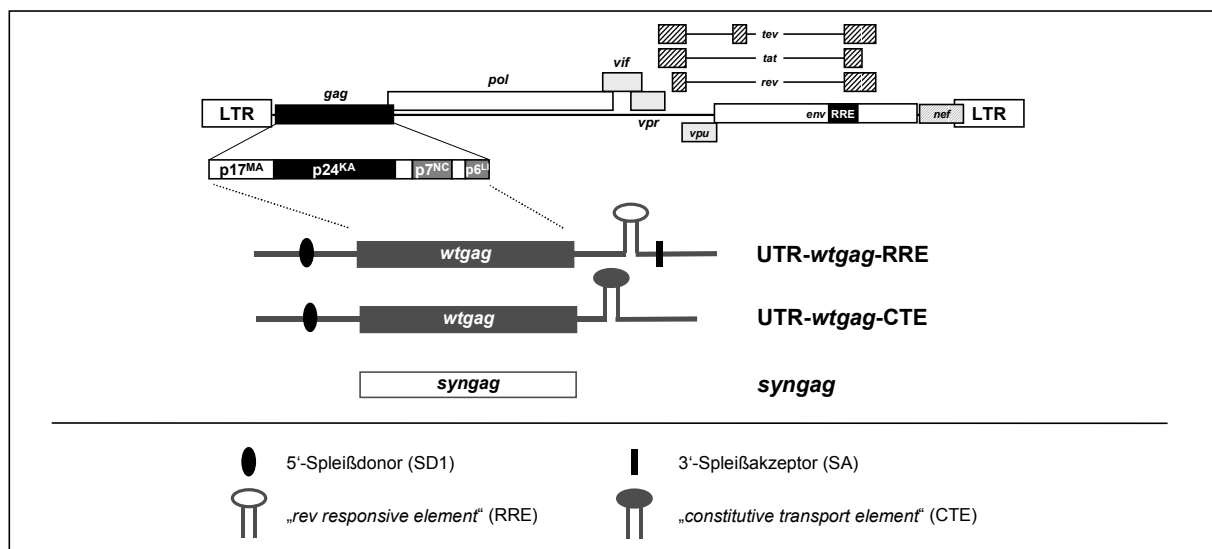


Abbildung C-1 Schematische Darstellung der Rev-abhängigen (pc-UTRwtgagRRE) und Rev-unabhängigen (pc-UTRwtgagCTE; pc-syngag) eukaryontischen Expressionsvektoren. Neben den für das Pr55^{gag} Protein kodierenden Regionen (1538nt) sind zudem die jeweiligen 5'- und 3'-nicht translatierten Bereiche angezeigt. Die transkribierte pre-mRNA von pc-syngag sollte demnach zwischen 2000-2100 Nukleotide, die von pc-UTRwtgagRRE ungefähr 3000-3100 Nukleotide und die von pc-UTRwtgagCTE ca. 2400-2500 umfassen.

Für die Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das virale gruppenspezifische Antigen, Gag, ist allerdings die Verwendung des viralen Ko-Faktors Rev unerwünscht. Eine Rev-unabhängige Expression kann allerdings durch die Verwendung alternativer cis-aktiver Exportsignale, wie z.B. dem CTE (*cis-acting constitutive transport element*) des Typ-D retroviralen Mason-Pfizer Monkey

Virus (MPMV), erzielt werden (**UTR-wtgag-CTE**). Desweiteren konnten wir in unserer Arbeitsgruppe durch die Anpassung der Kodonwahl des gag Leserahmens an das von hochexprimierten Säugetiergenen (**syngag**), eine von cis,- und trans-ständigen Faktoren unabhängige Gag Expression erreichen (Graf et al., 2000).

Zur Austestung und Evaluierung von DNA-Vakzine Kandidaten im Balb/c-Mausmodell wurde zunächst die Expression der verschiedenen Rev-abhängigen und Rev-unabhängigen Pr55^{gag} Expressionskonstrukte (vgl. Abb. C-1), welche bereits in verschiedenen Primatenzellen detailliert charakterisiert wurden (M. Graf, Dissertation 2000, IMMH Regensburg), in diversen Nagetierzelllinien untersucht.

C.1.1 Reduzierte Expression INS-haltiger, Gag-spezifischer Gene in Nagetierzellen

C.1.1.1 Gag Expression in verschiedenen Nagetierzellen

Obwohl u.a. anhand gekoppelter *in vitro* Transkriptions/Translations-Experimente für die verwendeten Gag-Expressionskonstrukte bereits gezeigt werden konnte, daß sowohl Ereignisse der Transkription als auch der Translation keinen Einfluß auf die Gag Expression haben (Graf et al., 2000), wurden in den untersuchten murinen Zelllinien 3T3, C₂C₁₂ und mKSA, sowie den Hamsterzellen CHO und BHK-21 im Vergleich zu humanen Zellen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Effizienz der Rev/RRE,- und CTE-vermittelten Expression festgestellt (vgl. Abb. C-2). So konnte in den humanen Zellen nach Transfektion des Rev-abhängigen Konstrukts (pc-UTRwtgagRRE) durch Ko-Transfektion einer für Rev kodierender Plasmid-DNA, pC-Rev (Dr. PD J. Hauber, Erlangen), die Gag Expression durchschnittlich um den Faktor 4-5 gesteigert werden, während im Gegensatz dazu die Expression in den Nagetierzellen nach Ko-Transfektion von pC-Rev zumeist unverändert war. Die maximale Expressionssteigerung, die in anderen Experimenten vereinzelt beobachtet werden konnte, lag lediglich bei einem Faktor von 2. In ähnlicher Weise wurde in den humanen Zellen nach Transfektion des Rev-unabhängigen Pr55^{gag} Expressionskonstrukts (pc-UTRwtgagCTE) eine im Vergleich zu dem Rev-abhängigem Konstrukt UTR-wtgag-RRE, eine ebenfalls um den Faktor 3-4 gesteigerte Gag Expression beobachtet, während wiederum in allen Nagetierzellen lediglich eine vergleichbare (Faktor 1-1,5) bzw. in Einzelfällen leicht reduzierte Gag Expression nachgewiesen werden konnte (Reduktion von Faktor 1,5-2,5). Allerdings konnte gezeigt werden, daß nach Transfektion des zweiten Rev-unabhängigen Konstrukts pc-syngag, dessen kodierende Sequenz an die hochexprimierter Säugetiergene angepaßt worden war, sowohl in den humanen als auch allen untersuchten Nagetierzellen eine gegenüber mit pc-UTRwtgagRRE transfizierten Zellen um den Faktor 4-10 gesteigerte Gag Expressionsrate erzielt wurde. Während zusammenfassend in den humanen Zellen der Unterschied zwischen der Gag Expression nach Transfektion des Rev-abhängigen Konstrukt (UTR-wtgag-RRE) in Anwesenheit von Rev bzw. des Rev-unabhängigen Expressionskonstrukts (UTR-wtgag-RRE) und der pc-syngag Plasmid-DNA lediglich minimal war (Faktor ~1,5), war die beobachtete Steigerung der Expressionsrate nach Transfektion von pc-syngag in den Nagetierzellen um so signifikanter (Faktor 4-10). Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß die retroviralen, den Export der viralen INS-haltigen pre-mRNA vermittelnden Faktoren Rev/RRE und CTE in Nagetierzellen nicht oder nur bedingt funktionsfähig sind. Im Gegensatz dazu war die Expression des synthetischen gag Gens unabhängig von Zelltyp-spezifischen Faktoren.

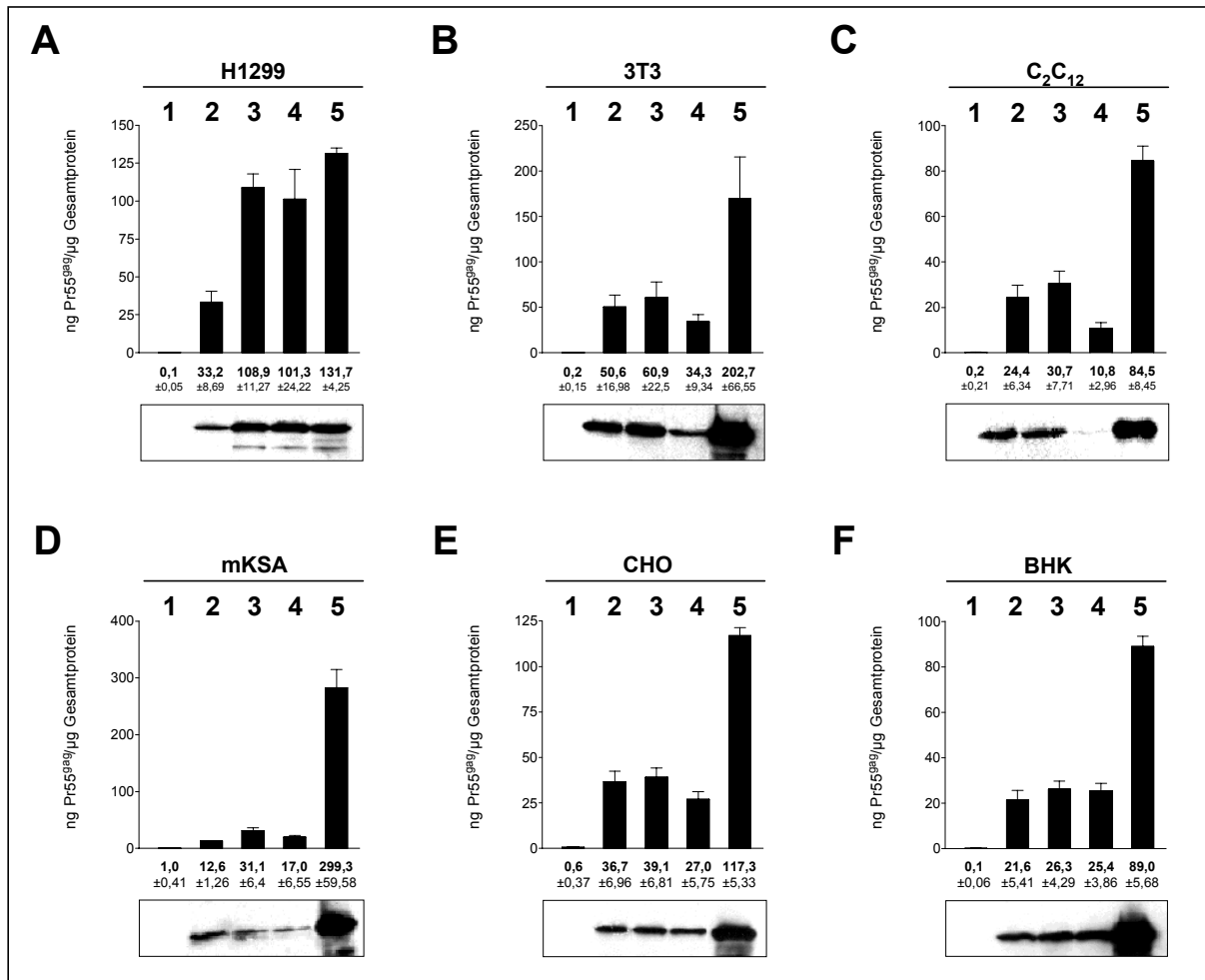


Abbildung C-2 Pr55^{gag} Expressionsanalyse in unterschiedlichen Säugetierzelllinien. Nach Transfektion verschiedener Zelllinien (A-F) mit den entsprechenden Rev-abhängigen und Rev-unabhängigen Expressionskonstrukten ((1) pcDNA3.1, (2) pc-UTRwtgagRRE, (3) pc-UTRwtgagRRE + pC-Rev, (4) pc-UTRwtgagCTE und (5) pc-syngag), wurden die Zellsate geerntet und je Zelllinie gleiche Mengen Gesamtprotein (100-180μg) in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe Gag-spezifischer Antikörper (13/5 und 16/4/2) durch Immunoblotting detektiert (untere Abbildung). Zudem wurde die Pr55^{gag} Konzentration in den Zellsaten mittels ELISA quantifiziert (ng Pr55^{gag}/μg Gesamtprotein) (obere Abbildung). (A) H1299, human (B) 3T3, murin, (C) C₂C₁₂, murin, (D) mKSA, murin, (E) CHO, Hamster, (F) BHK, Hamster.

C.1.1.2 Synthese und Export Gag-spezifischer RNA in Nagetierzellen

Da sowohl die Rev/RRE,- wie auch die CTE-vermittelte Protein Expression auf der Ebene des RNA-Exports reguliert wird, wurde desweiteren das Verhältnis der nukleären und zytoplasmatischen Gag-spezifischen RNA Transkripte nach Transfektion humaner (H1299, 293T) und verschiedener Nagetierzelllinien (3T3, C₂C₁₂, CHO, BHK) mit den jeweiligen Rev-abhängigen und Rev-unabhängigen Pr55^{gag} Expressionskonstrukten im Northern Blot untersucht (vgl. Abb. C-3). Dabei konnte zunächst beobachtet werden, daß in den humanen Zelllinien H1299 und 293T (nicht gezeigt) und der Hamsterzelllinie CHO (nicht gezeigt) alle Gag-spezifischen RNA Spezies im Zellkern vorhanden waren. Dahingegen waren die verschiedenen nukleären Gag-spezifischen RNAs in allen murinen Zellen, mit Ausnahme der synthetischen mRNA (syngag), kaum detektierbar. Ferner konnte gezeigt werden, daß in den humanen Zellen der Export des UTRwtgagRRE Transkripts durch die Anwesenheit des viralen Exportfaktors Rev deutlich gesteigert werden konnte (Faktor ca. 5-10), während trotz Anwesenheit von Rev weder in den murinen Zelllinien 3T3 und C₂C₁₂, noch in der Hamsterzelllinie CHO ein erhöhte Konzentration Gag-

spezifischer RNAs im Zytoplasma nachzuweisen war. Nach Transfektion des Rev/RRE-unabhängigen Expressionsvektors pc-UTRwtgagCTE konnte zwar in den humanen Zellen die Gag-spezifische RNA im Zytoplasma detektiert werden, nicht aber in der entsprechend transfizierten Hamsterzelllinie CHO. Obwohl bereits nur geringe Mengen Gag-spezifischer RNA im Zellkern von mit pc-UTRwtgagCTE transfizierten murinen Zellen vorhanden waren, wurden dennoch äquivalente RNA-Mengen im Zytoplasma detektiert. Im Gegensatz zu den INS-haltigen wtgag RNA-Spezies, konnte die synthetische Gag-RNA Zelltyp-unabhängig sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma der Zellen in großen Mengen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse implizieren, daß sich die Ursachen der reduzierten Rev/RRE,- bzw. CTE vermittelten Expression INS-haltiger wtgag Gene in den murinen Zellen möglicherweise von denen der Hamsterzellen unterscheiden. Während in den murinen Zelllinien vorwiegend die Stabilität INS-haltiger Gag-spezifischer RNA Spezies im Zellkern und weniger der RNA-Export, beeinträchtigt zu sein schien, wurden in den CHO Zellen die INS-haltigen RNAs trotz Anwesenheit der alternativen, in humanen Zellen funktionstüchtigen cis,- und trans-ständigen Faktoren nicht effizient exportiert. Im Gegensatz dazu war die synthetische Gag-spezifische RNA in allen untersuchten Zelllinien nukleär stabil und wurde ebenso effizient exportiert.

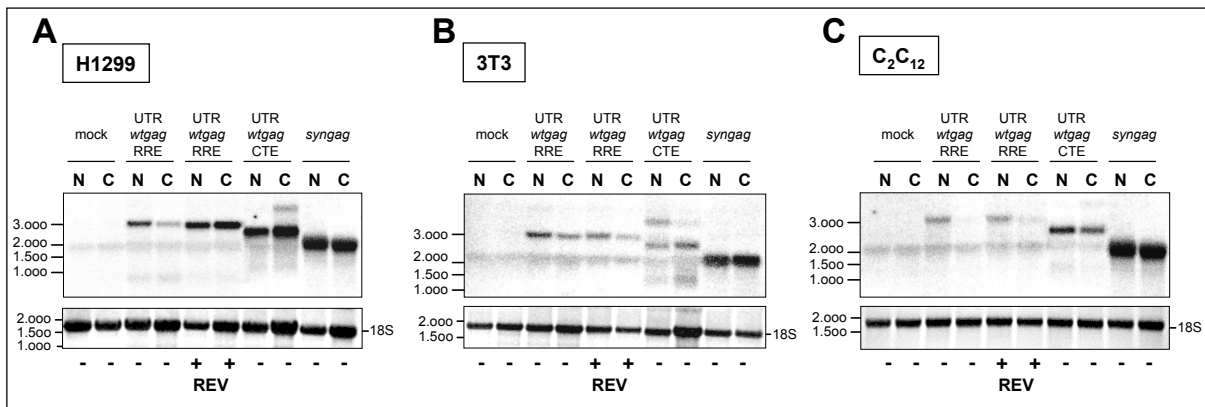


Abbildung C-3. Northern Blot Analyse gag-spezifischer RNA-Transkripte im Zellkern (N) bzw. exportierter RNA im Zytoplasma (C) von mit mock (pcDNA3), pc-UTRwtgagRRE mit (+) und ohne (-) pc-Rev, UTRwtgagCTE und pc-syngag transfizierten (A) humanen H1299 Zellen sowie (B) der murinen Zelllinien 3T3 und (C) C₂C₁₂. Je 10 µg Gesamt RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die verschiedenen RNA-Spezies (UTR-wtgag-RRE: ~3000nt, UTR-wtgag-CTE: ~2500nt und syngag: ~2000nt) mit einem Gemisch (Verhältnis 1:1) aus wtgag und syngag spezifischen, mit [³²P]-markierten Sonden detektiert. Die Menge an unspezifisch angefärbter 18S rRNA diente hierbei als interne Kontrolle.

C.1.1.3 Expression und nukleäre Lokalisation des Rev Proteins

Zur weiteren Untersuchung der RRE/Rev-abhängigen Expression des HI-viralen Pr55^{gag} Polyproteins in Nagetierzellen sollte im folgenden die nukleäre Lokalisation des viralen Regulatorproteins Rev mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach Transfektion der Expressionsvektoren pC-Rev bzw. pCsRevsg25GFP (M. Neumann, GSF München) überprüft werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach Transfektion humaner H1299 Zellen mit pC-Rev im Vergleich zu mit pCsRevsg25GFP transfizierten Zellen lediglich geringe Mengen Rev-spezifischer RNA nachweisbar waren und auch das Protein, vermutlich aufgrund der geringen Expressionsrate, mittels Immunoblotting nicht detektiert werden konnte. Dennoch wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sowohl Rev als auch das RevGFP-Fusionsprotein in humanen sowie auch in den Nagetierzellen 3T3, C₂C₁₂, CHO und BHK überwiegend im Zellkern lokalisiert (D.Hammer, Diplomarbeit 2000, IMMh, Regensburg). Dadurch konnte eine mögliche Dislokation des viralen Rev Proteins in Nagetierzellen, welche möglicherweise eine Blockierung des Rev/RRE-vermittelnden RNA-Exports erklären würde, ausgeschlossen werden.

C.1.1.4 Gag Expression und RNA-Export in stabilen Revgfp-Zelllinien

C.1.1.4.1 Herstellung und Charakterisierung stabiler Revgfp-Zelllinien

Zur weiteren Untersuchung wurden verschiedene stabil das Fusionsprotein REVgfp (47kDa) exprimierende Zelllinien hergestellt, um eine maximale Expression des HI-viralen Exportfaktors zu gewährleisten und mögliche experimentelle Abweichungen bei der Ko-Transfektion von DNA-Plasmiden auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde die humane Zelllinie H1299, die murine Zelllinie 3T3 sowie die Hamsterzelllinie CHO mit pCsRevsg25GFP (*NeoR*⁺) transfiziert und positive Transfektanten selektioniert. Die Analyse der stabilen Zelllinien H1299REVgfp, 3T3REVgfp und CHOREVgfp Zelllinien erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse (vgl. Abb. C-4). Dabei konnte gezeigt werden, daß die humane Zelllinie H1299REVgfp zu 88%, die murine Zelllinie 3T3REVgfp zu 50% und die Hamsterzelllinie CHOREVgfp zu 80% stabil das Revgfp Fusionsprotein exprimierten. Ferner wurde die Revgfp Expression im Western Blot mittels Rev,- bzw. GFP-spezifischer Antikörper überprüft und bestätigt (nicht gezeigt).

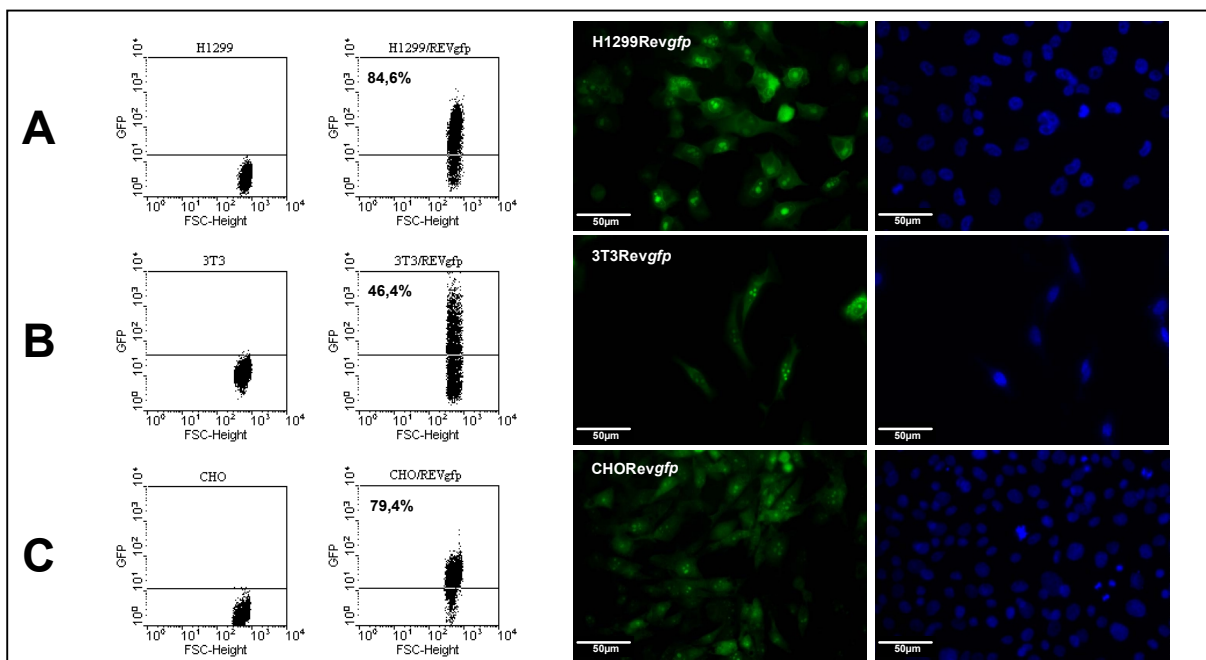


Abbildung C-4 Charakterisierung der stabilen Zelllinien (A) H1299Revgfp, (B) 3T3Revgfp und (C) CHOREVgfp mittels FACS-Analyse (linke Abbildungen) und Fluoreszenzmikroskopie (rechte Abbildungen).

C.1.1.4.2 Analyse der Pr55^{gag} Expression und des RNA-Exports

Im folgenden sollte die Synthese und der Export INS-haltiger wtgag RNA, sowie die Gag Expression in verschiedenen Zelllinien, welche das Rev Protein stabil und in großen Mengen exprimierten, verglichen werden. Nach Transfektion von pc-UTRwtgagRRE konnte hierbei mittels Northern Blot Analyse (vgl. Abb. C-5) gezeigt werden, daß in Anwesenheit großer Mengen REVgfp zumindest die Gag-spezifischen RNAs sowohl in den Zellkernen der murinen Zelllinie 3T3 und der Hamsterzelllinie CHO stabilisiert werden. Dennoch war, insbesondere in der Hamsterzelllinie CHO, der RNA-Export im Vergleich zu der humanen Zellen drastisch reduziert. Die absoluten Pr55^{gag} Expressionsraten in den stabilen, das RevGFP-Fusionsprotein exprimierenden Zelllinien waren dabei identisch mit den entsprechenden Konzentrationen nach Ko-Transfektion von pc-UTRwtgagRRE und pCsRevsg25GFP (nicht gezeigt).

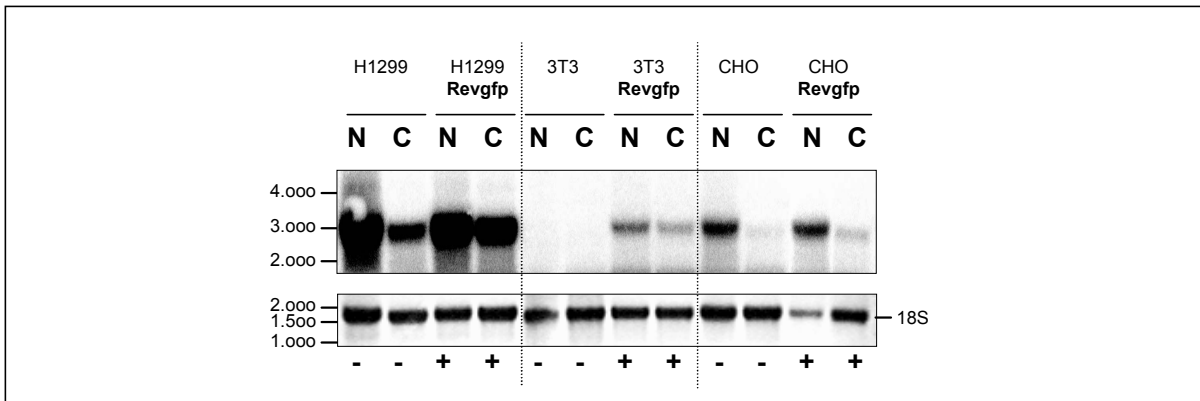


Abbildung C-5. Analyse des Rev/RRE-abhängigen RNA-Exports in verschiedenen stabilen, Revgfp-exprimierenden Zelllinien. 36h nach Transfektion der Zelllinien H1299, 3T3 und CHO sowie der stabilen Revgfp-exprimierenden Zelllinien H1299Revgfp, 3T3Revgfp und CHORevgfp mit dem Rev-abhängigem Expressionskonstrukt UTR-wtgag-RRE wurde die RNA aus dem Zellkern (N) und aus dem Zytoplasma (C) isoliert, je 10µg Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer radioaktiven, wtgag-spezifischen RNA-Sonde detektiert. Die Menge unspezifisch angefärbter 18S rRNA diente hierbei als interne Kontrolle. (- = in Abwesenheit von Rev; + = in Anwesenheit von Rev)

C.1.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, daß, im Vergleich zu humanen und nicht-humanen Primatenzellen, die retroviralen Rev/RRE,- und CTE-Exportmechanismen in Nagetierzellen aus bislang noch ungeklärten Gründen nicht oder nur bedingt funktionsfähig sind. Während allerdings in den murinen Zelllinien die nukleäre Stabilität INS-haltiger wtgag RNA generell reduziert und der beobachtete, minimale „Rev-Effekt“ vermutlich lediglich die Ursache einer erhöhten RNA-Stabilität UTR/RRE-haltiger wtgag RNA zu sein scheint, wird in der Hamsterzelllinie CHO die ohnehin nukleär stabile INS-haltige wtgag RNA im Vergleich zu Primatenzellen nur sehr ineffizient exportiert. Aus vermutlich diesen Gründen ist die Pr55^{gag} Expression nach Transfektion INS-haltiger Rev-abhängiger (UTRwtgagRRE+Rev) und Rev-unabhängiger (UTRwtgagCTE) Expressionskonstrukte in den untersuchten Nagetierzellen im Vergleich zu den Primatenzelllinien, wie z.B. H1299, 293T und COS-7, signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu konnte eine zelltyp,- und gewebespezifische, maximale Gag Expression durch die Adaption der wtgag Kodonwahl an das von hochexprimierten Säugetiergenen (syngag) erzielt werden. Diese nicht INS-haltige syngag RNA war in allen Zelllinien nukleär stabil und wurde auch ohne zusätzlichen retroviralen cis,-und trans-aktiven Faktoren effizient aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert. Dieses synthetische Expressionskonstrukt gewährleistet somit eine effiziente und von viralen Faktoren unabhängige Gag Expression in unterschiedlichen eukaryontischen Zellkultursystemen und stellt somit einen geeigneten DNA-Vakzine Kandidaten dar.

C.1.2 Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs) in Nagetierzellen

Das virale gruppenspezifische Antigen wird ko-translational am N-terminalem Glyzinrest (Gly²) myristyliert und nach Transport an die Zytoplasmamembran kovalent in der Plasmamembran verankert (vgl. A.2). Infolgedessen werden von der Zellmembran Virus-ähnliche Lipoproteinpartikel (VLPs; „virus-like particles“) abgeschnürt und in den Überstand freigesetzt. Die Ausbildung von VLPs, als Folge einer transienten Gag Expression, wurde bereits für diverse Zellkultursysteme dokumentiert (Smith et al., 1990, Mergener et al., 1992; Kräuslich et al., 1993;

Wagner *et al.*, 1991 und 1992; Gheysen *et al.*, 1992; Royer *et al.*, 1991). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob, im Vergleich zu humanen und nicht-humanen Primatenzellen, Nagetierzellen prinzipiell in der Lage sind VLPs abzuschnüren. Dazu wurde nach Transfektion des Rev-unabhängigen Expressionsvektors pc-syngag die Expression und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs) in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Ferner sollten die freigesetzten Lipoproteinpartikel biophysikalisch analysiert werden.

C.1.2.1 Gag Expression und Freisetzung von Pr55^{gag}-VLPs

Nach Transfektion des Rev-unabhängigen Expressionskonstrukts pc-syngag konnte in allen untersuchten, eukaryontischen Zelllinien die Expression des HI-viralen Gag Proteins sowie die Freisetzung von Virus-ähnlichen Pr55^{gag}-Partikel in den Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (vgl. C-6, A.1 und 2).

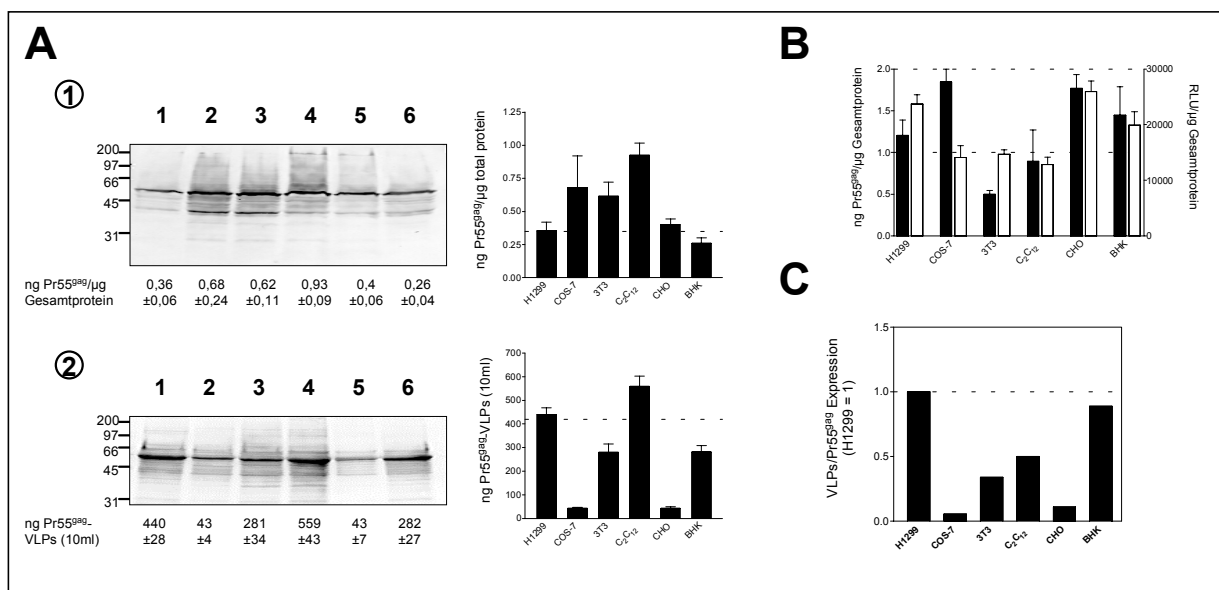


Abbildung C-6 Gag Expression und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs) in verschiedenen Zelllinien. **(A)** Die Zelllinien **(1)** H1299, **(2)** COS-7, **(3)** 3T3, **(4)** C₂C₁₂, **(5)** CHO und **(6)** BHK wurden mit dem Expressionsvektor pc-syngag (45μg) transfiziert. Nach 36h wurden die Überstände geerntet und die Zellysate präpariert. **(A.1)** Von den Zellysaten wurden je 100μg Gesamtprotein in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und das Gag Protein mittels den p24-spezifischen Antikörpern 16/4/2 und 13/5 im Immunoblot detektiert. Ferner wurde die Pr55^{gag} Konzentration in den Zellysaten mittels ELISA bestimmt (ng Pr55^{gag}/μg Gesamtprotein). **(A.2)** Die Pr55^{gag}-VLPs wurden aus dem Überstand (10ml) aufgereinigt und je 1/2 der VLPs wurden anschließend in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe p24-spezifischer Antikörper (16/4/2, 13/5) im Western Blot detektiert. Ferner wurde die Pr55^{gag} Konzentration in den aufgereinigten VLPs mittels ELISA bestimmt (ng Pr55^{gag}-VLPs/10ml). **(B)** Die verschiedenen Zelllinien wurden mit pc-syngag (14μg) und, als interne Kontrolle, mit dem Luziferase-Reporterkonstrukt pGL2-control (1μg) ko-transfiziert. 36h nach Transfektion wurde aus den Zellysaten die exprimierte Pr55^{gag}-Menge im ELISA quantifiziert (ng Pr55^{gag}/μg Gesamtprotein) und die Luziferase Aktivität bestimmt (RLU/μg Gesamtprotein). **(C)** Verhältnis von intrazellulärem Pr55^{gag} Protein und extrazellulärem, freigesetzten Pr55^{gag} VLPs in Relation zur humanen Zelllinie H1299 (= 1).

Die absolute Gag Expression korrelierte dabei, mit Ausnahme der SV-40 transformierten COS-7 Zellen, mit der Transfektionseffizienz der entsprechenden Zelllinie (vgl. C-6, B). Obwohl das Verhältnis an freigesetzten Pr55^{gag}-VLPs und den intrazellulär exprimierten Gag Mengen in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich war (vgl. Abb. C-6, C), konnte dennoch keine allgemeingültige Inhibition der Pr55^{gag}-Partikel Freisetzung in den Nagetierzellen nachgewiesen werden. So war zwar, im Vergleich zur humanen Zelllinie H1299, die Partikelfreisetzung in Relation zur intrazellulären Gag Konzentration in den murinen Zellen 3T3 und C₂C₁₂ um 50% reduziert, jedoch in der Hamsterzelllinie BHK nahezu identisch mit der humanen Zelllinie H1299.

Ferner konnte für die nicht-humane Primatenzelllinie COS-7 und die Hamsterzelllinie CHO eine stark reduzierte Freisetzung von VLPs nachgewiesen werden. Somit wurde indirekt gezeigt, daß Nagetierzellen prinzipiell in der Lage sind, das Pr55^{gag} Vorläuferprotein ko-translational mit einem Myristylsäureanker zu versehen, das Protein an die Zytoplasmamembran zu transportieren, dort kovalent zu verankern und partikuläre Lipoproteinpartikel (VLPs) in den extrazellulären Raum freizusetzen.

C.1.2.2 Bestimmung der Dichte freigesetzter Pr55^{gag}-VLPs

Zur biophysikalischen Charakterisierung der von verschiedenen Zelllinien freigesetzten Pr55^{gag}-Partikel, wurden die VLPs aus den Zellkulturüberständen von mit pc-syngag transfizierten Zellen über ein 30%iges Sukrosekissen vorgereinigt, und anschließend die Partikeldichte in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (10-50%) bestimmt (Gleichgewichtszentrifugation). Die aus den verschiedenen Nagetierzellen freigesetzten VLPs sedimentierten dabei in denselben Fraktionen wie die aus der humanen Zelllinie H1299 bzw. Affenzelllinie COS-7 freigesetzten Partikel (nicht gezeigt). Die Pr55^{gag}-Partikel wiesen dabei eine homogene Dichte von 1,16 g/cm³ auf. Somit konnte gezeigt werden, daß sich die aus verschiedenen eukaryontischen Zellen freigesetzten Pr55^{gag}-VLPs biophysikalisch nicht unterscheiden.

C.1.3 Expression, Partikel Freisetzung und Prozessierung der Gag und Gagpol Vorläuferproteine in Nagetierzellen

Erst kürzlich wurde veröffentlicht, daß in Nagetierzellen der zielgerichtete Transport der Vorläuferproteine Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} an die Zytoplasmamembran gestört ist und infolgedessen keine viralen Partikel freigesetzt werden können. Diese Ergebnisse wurden nach Infektion von Nagetierzellen, die stabil die Rezeptoren hCD4, hCXCR4 bzw. hCCR5 sowie den Ko-Faktor hCyclinT1 der Tat-vermittelten, viralen Transkription, exprimierten, mit VSV-G pseudotypisierten HI-Viren bzw. Wildtyp HI-Viren erzielt (Bieniasz und Cullen, 2000; Mariani *et al.*, 2000 und 2001). Da in den vorausgegangenen Untersuchungen allerdings gezeigt werden konnte, daß bei Verwendung des Rev-unabhängigen Expressionskonstrukts pc-syngag die Freisetzung von Pr55^{gag}-VLPs in Nagetierzellen prinzipiell nicht blockiert ist, sollte im folgenden zur Aufklärung dieser gegensätzlichen Forschungsergebnisse weitere Hinweise einer Inhibition post-translationaler, viraler Prozesse in Nagetierzellen untersucht werden. Hierzu wurde u.a. ein synthetisches, ebenfalls an den Kodongebrauch hochexprimierter Säugetiergene angepaßtes *syngagpol* (4343 bp) Expressionskonstrukt verwendet (Dissertation Marcus Graf, 2000, IMMh Regensburg), dessen kodierende Sequenz lediglich in dem Bereich, der für den ribosomalen Leserastersprunges verantwortlich ist (1298-1558nt), nicht verändert wurde. Ferner sollte im Hinblick auf die Entwicklung einer *syngagpol* DNA-Vakzine die effiziente Expression sowie Freisetzung und korrekte Prozessierung der viralen Vorläuferproteine durch die virale Protease in Nagetierzellen sichergestellt werden.

C.1.3.1 Der ribosomale Leserastersprung ist in Nagetierzellen funktionell

Eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung infektiöser Viruspartikel ist das durch einen ribosomalen -1 Leserastersprung (5%) nahe dem 3'-Ende des für das Gag Protein kodierenden Bereichs bestimmten Verhältnis (20:1) der viralen Vorläuferproteine Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol},

welches neben den viralen Strukturproteinen für die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase kodiert (vgl. A.2). Die Aktivität der Protease wiederum spielt eine wichtige Rolle bei der zeitlich regulierten Prozessierung der Vorläuferproteine und Reifung infektiöser Viruspartikel. Im folgenden sollte untersucht werden, ob der ribosomale –1 Leserastersprung in verschiedenen Nagetierzellen ebenfalls mit der gleichen Effizienz stattfindet, wie in humanen Zellen. Dazu wurden diverse Zelllinien mit Luziferase-Reporterkonstrukten (vgl. Abb. C-7), die von C. Ludwig im Rahmen ihrer Diplomarbeit (1999, IMMH Regensburg) entwickelt wurden, transfiziert und hinsichtlich ihrer Luziferase Expression, die abhängig von der Effizienz eines HI-viralen ribosomalen Leserastersprungs ist, analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß der –1 ribosomale Leserastersprung in den Primatenzellen H1299 (4,5% \pm 0,8), 293T (5,7% \pm 0,8) und COS-7 (4,6% \pm 0,3) sowie den Nagetierzellen 3T3 (4,6% \pm 1,9), C₂C₁₂ (3,4% \pm 1,2), CHO (4,9% \pm 0,1) und BHK (3,4% \pm 0,7) mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 3-6% stattfindet. Dies entspricht näherungsweise dem *in vivo* ermittelten Wert des HI-viralen ribosomalen –1 Leserastersprungs von 5%. Somit konnte gezeigt werden, daß der ribosomale Leserastersprung in Nagetierzellen funktionell ist.

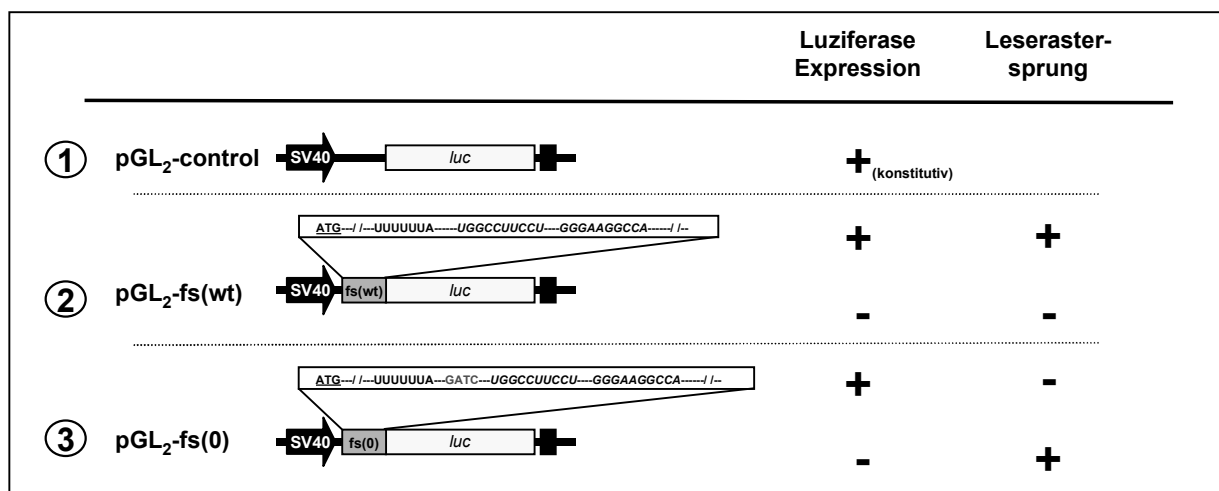


Abbildung C-7 Schematische Darstellung der Luziferase-Reporterkonstrukte zur Bestimmung der Häufigkeit des HI-viralen –1 ribosomalen Leserastersprungs. Die Reporterkonstrukte wurden auf der Basis des pGL₂-Vektors (Promega, Mannheim) entwickelt. (1) Der pGL₂-control exprimiert konstitutiv das Luziferase Gen unter Kontrolle des frühen SV40 Promotors. (2) Das davon abgeleitete Konstrukt pGL₂-fs(wt) besitzt 5' eine, um den für den HI-viralen –1 Leserastersprung verantwortlichen Bereich verlängerte (1-96 nt) Region (10-96 nt), welche sowohl die „slippery“-Sequenz –UUUUUUA– (27-33 nt), als auch die für die Ausbildung der Haarnadelschleife essentiellen Sequenzen beinhaltet (43-52; 57-66 nt). Hierbei wird nur dann Luziferase exprimiert, wenn sich 5'- des luc-Leserahmens ein –1 Leserastersprung ereignet. (3) Das Konstrukt pGL₂-fs(0) besitzt unmittelbar nach der „slippery“ Sequenz eine Insertion (GATC), so daß nur dann Luziferase exprimiert wird, wenn sich kein Leserastersprung ereignet. Anderenfalls würde die Translation aufgrund eines nachfolgenden Stop-Kodons frühzeitig beendet werden.

C.1.3.2 Intrazelluläre und intrapartikuläre Prozessierung der Pr55^{gag} bzw. Pr160^{gagpol} Vorläuferproteine in Nagetierzellen

In den folgenden Experimenten sollte die Prozessierung der viralen Vorläuferproteine Pr55^{gag} bzw. Pr160^{gagpol} in die Strukturproteine p17^{MA}, p24^{KA}, p7^{NC} und p6^{LI} in Nagetierzellen untersucht werden. Dazu wurden verschiedenen Zelllinien mit dem Rev-unabhängigen, Pr55^{gag}/Pr160^{gagpol} Expressionskonstrukts pc-syngagpol transfiziert und die Spaltprodukte der Vorläuferproteine in An-, und Abwesenheit des Proteaseinhibitors Saquinavir sowohl in Zellysaten als auch in den freigesetzten Virus-ähnlichen Partikeln mittels einem Gemisch aus p24,- sowie p17-spezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht (vgl. Abb. C-8, B).

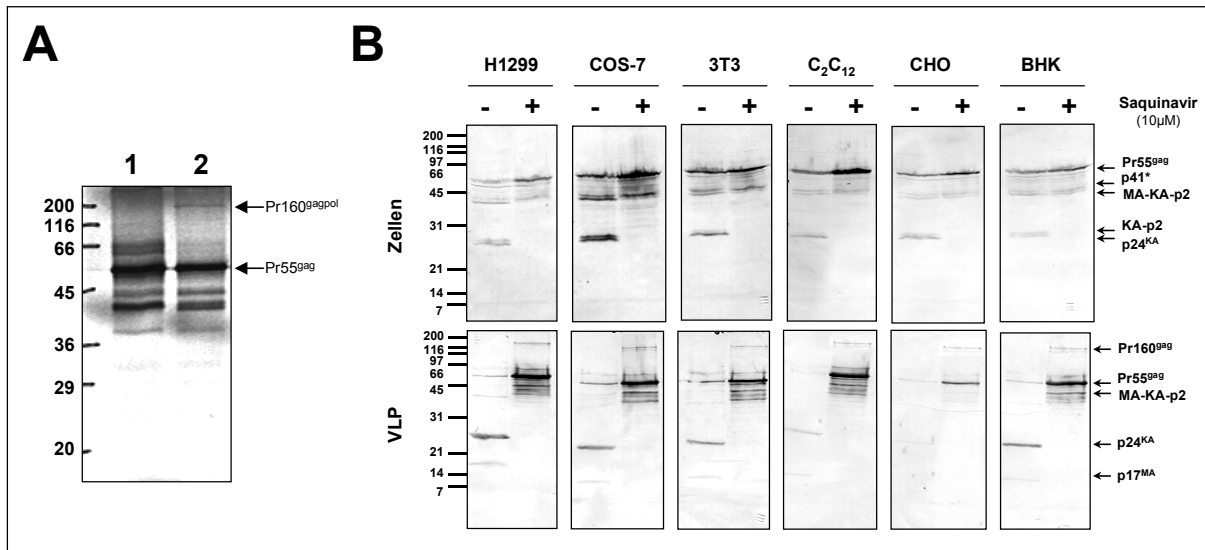


Abbildung C-8 Expression und Prozessierung der Gag bzw. Gagpol Vorläuferproteine in diversen Zelllinien **(A)** Analyse der Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} Expression mittels gekoppelter *in vitro* Transkription/Translation (Promega, Mannheim) der Expressionsvektoren (1) pc-syngag und (2) pc-syngagpol. **(B)** 36h nach Transfektion der humanen Zelllinie H1299, der Primatenzelllinie COS-7, der murinen Zelllinien 3T3 und C₂C₁₂ sowie der Hamsterzelllinien CHO und BHK-21 mit pc-syngagpol in An (+),- bzw. Abwesenheit (-) des Proteaseinhibitors Saquinavir (10μM) wurden die in den Überstand freigesetzten Partikel (VLP) aufgereinigt und, ebenso wie die gewonnenen Zellysate (100μg Gesamtprotein) über ein 12,5%-iges SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gag bzw. Gagpol Vorläuferproteine sowie deren Spaltprodukte mittels p24,- und p17-spezifische Antikörper (16/4/2, 13/5, 3H7) im Western Blot detektiert.

Wie zunächst mittels gekoppelter Transkription/Translation des Expressionskonstrukts pc-syngagpol gezeigt werden konnte, wurde das 55kDa Gag Protein, wie auch in geringeren Mengen, das 160kDa Gagpol Vorläuferprotein in den erwarteten Mengenverhältnissen exprimiert (vgl. Abb. C-8, A). Des weiteren konnte nach Transfektion von pc-syngagpol in allen Zellysaten das unprozessierte Pr55^{gag} Polyprotein (MA-KA-p2-NC-p1-LI), das Pr41^{gag} Intermediat (MA-KA-p2), sowie bereits prozessiertes p24^{KA} bzw unprozessiertes p25/26 (KA-p2) detektiert werden. Ferner konnte in den freigesetzten Virus-ähnlichen Partikeln sowohl das vollständig durch proteolytische Abspaltung freigesetzte Kapsidprotein p24^{KA} als auch das Matrixprotein p17^{MA} nachgewiesen werden. Somit war die Prozessierung der viralen Vorläuferproteine in den freigesetzten VLPs weitaus fortgeschrittener als die der intrazellulären Proteine. In allen Zellen konnte in Anwesenheit des Proteaseinhibitors Saquinavir sowohl die intrazelluläre als auch intrapartikuläre Prozessierung der Vorläuferproteine inhibiert und die sekundären Spaltprozesse, nicht aber die Abspaltung des primären, gp41-Intermediats (MA-KA-p2) blockiert werden. Ferner konnte in Anwesenheit von Saquinavir in den freigesetzten Partikeln neben dem Pr55^{gag} Vorläuferprotein nun auch das unprozessierte Pr160^{gagpol} Polyprotein nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die HI-viralen Vorläuferproteine Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} in den für Primatenzellen üblichen Verhältnissen (20:1) *in vivo* gebildet werden, und weder die Freisetzung von Gag- bzw Gagpol Lipoproteinpartikeln noch die Prozessierung der Vorläuferprotein in die viralen Strukturproteine p17^{MA}, p24^{KA}, p7^{NC} und p6^{LI}, durch die virale Protease nachweislich blockiert ist.

C.1.4 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer geeigneten DNA-Vakzine gegen das HI-virale gruppenspezifische Antigen Gag (Pr55^{gag}) setzt gegebenermaßen eine effiziente Expression in humanen Zellen voraus. Allerdings verhindern cis-aktive, inhibitorische pre-mRNA Sequenzelemente eine effiziente Pr55^{gag} Expression. Durch die Verwendung verschiedener cis-aktiver RNA-Elemente (RRE, CTE) sowie trans-aktiver Faktoren (Rev) kann dennoch die Pr55^{gag} Expression in Primatenzellen gesteigert werden. Die aufgrund der notwendigen Bewertung eines Vakzine Kandidaten im Mausmodell vorgenommenen Expressionsanalysen in verschiedenen Nagetierzellen zeigten allerdings, daß auch die Rev/RRE,- und CTE-vermittelte Expression des Pr55^{gag} Proteins in allen untersuchten Zelltypen stark reduziert ist. Lediglich das durch Anpassung des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen generierte Gen *syngag* erzielte in allen getesteten Expressionssystemen eine hohe und konstante Pr55^{gag} Expression.

		UTR wtgag RRE/Rev	UTR wtgag CTE	<i>syngag</i>		<i>syngagpol</i>		
		Pr55 ^{gag} Expression		Pr55 ^{gag} Expression	Freisetzung (VLPs)	Expression	FS	Prozessierung Pr55 ^{gag} /Pr160 ^{gagpol}
Human	H1299	+++	+++	+++	+++	+++	✓	✓
	293T	+++	+++	+++	+++	+++	✓	n.d.
Affe	COS-7	+++	+++	+++	+	+++	✓	✓
Maus	3T3	+	+	+++	++	+++	✓	✓
	C₂C₁₂	+	+	+++	++	+++	✓	✓
	mKSA	+	+	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hamster	CHO	+	+	+++	+	+++	✓	✓
	BHK	+	+	+++	+++	+++	✓	✓

Abbildung C-9. Während die Pr55^{gag} Expression in den Nagetierzellen nach Transfektion des Rev-abhängigen Vektors UTR-wtgag-RRE in Anwesenheit von Rev bzw. des Rev-unabhängigen Vektors UTR-wtgag-CTE im Vergleich zu humanen Zellen und nicht-humanen Primatenzellen reduziert ist, wurde durch die Anpassung des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen (*pc-syngag*; *pc-syngagpol*) eine optimale Expression in allen Zelllinien erzielt. Die Abschnürung und Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikel (VLPs), der HI-virale -1 ribosomaler Leserastersprung sowie die Prozessierung der Gag-bzw. Gagpol Vorläuferproteine in den untersuchten Nagetierzellen waren vergleichbar mit den humanen Zellen bzw. Primatenzellen. (FS = „frameshift“, -1 ribosomale Leserastersprung; n.d. = „not determined“, nicht bestimmt, + gering; ++ moderat +++ maximal; ✓ ja; - nein)

Die Verwendung dieser potentiellen DNA-Vakzine erlaubt zudem den Verzicht auf die Ko-Expression des trans-aktiven viralen Faktor Rev. Darüber hinaus wird eine erhöhte Sicherheit gewährleistet, da der *syngag* Vektor kein virales RNA Verpackungssignal (Ψ) (vgl. A.2) enthält und aufgrund der veränderten Nukleotidsequenz eine mögliche Rekombination mit HIV-Wildtyp Sequenzen verhindert. Ferner konnte nach Transfektion von *pc-syngag* gezeigt werden, daß Nagetierzellen ebenso wie humane Zellen und Primatenzellen in der Lage sind Virus-ähnliche Partikel mit einer Dichte von 1,16g/cm³ abzuschnüren und freizusetzen. Weiterhin wurde durch die Verwendung eines Kodon-optimierten, synthetischen *syngagpol* Expressionsvektors bewiesen, daß sich weder die Expression, die Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel sowie die Prozessierung der HI-viralen Vorläuferproteine Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} in den untersuchten Nagetierzellen und den Primatenzellen, d.h. den natürlichen „Wirtszellen“ des HI-Virus, unterscheidet.

C.2 DNA-Immunisierung: vergleichende immunologische Studien im Balb/c-Mausmodell

Die Effizienz der Immunogenität von aus dem HI-viralem gruppenspezifischem Antigen Pr55^{gag} abgeleiteten replikations-inkompetenten Virus-ähnlichen Lipoproteinpartikeln (VLPs) wurde bereits in unterschiedlichen Tiermodellen bestätigt (Deml *et al.* 1997; Notka *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurden zur Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das virale Pr55^{gag} Protein bereits im Rahmen der Diplomarbeit (A.Bojak 1998, IMM H Regensburg) und in Zusammenarbeit mit M. Graf unterschiedliche Pr55^{gag} Expressionsvektoren kloniert, die in humanen Zellsystemen detailliert charakterisiert wurden (Graf *et al.*, 2000). Den immunologischen Studien im Balb/c-Mausmodell vorausgehend wurden die verschiedenen Expressionskonstrukte hinsichtlich der Pr55^{gag}-Expression in unterschiedlichen murinen und anderen Nagetierzelllinien analysiert. Anhand dieser in Kapitel C.1 beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die durch die retroviralen cis,- und trans-ständigen Exportelemente RRE/Rev bzw. CTE vermittelte Gag Expression in den untersuchten Nagetierzellen signifikant reduziert war. Dabei konnte zudem nachgewiesen werden, daß ausschließlich das durch Anpassung des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen synthetisch hergestellte Expressionskonstrukt *syngag* Zelltyp unabhängig und effizient exprimiert wird. Ferner wurde demonstriert, daß die Expression des Pr55^{gag} Vorläuferproteins auch in Nagetierzellen und insbesondere auch in murinen Muskelzellen zur Ausbildung und Freisetzung hoch-immunogener, partikulärer Virus-ähnlicher Partikel führt. In der folgenden immunologischen Studie sollte die Effizienz der verschiedenen DNA-Vakzine Kandidaten, nach i.m. Immunisierung eine Gag-spezifische humorale Immunantwort *in vivo* zu induzieren, analysiert werden.

Maximale humorale Immunantwort durch Adaption des Kodongebrauchs

Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit je 20µg bzw. 100µg der entsprechenden Plasmid-DNA intramuskulär (*Tibialis anterior*) immunisiert. Je 7 Tage nach der primären Immunisierung bzw. 2 Wochen nach der ersten und eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung wurden die absoluten Gag-spezifischen Ig-Titer sowie die AK-Isotypen IgG1 und IgG2a im Serum der immunisierten Tiere bestimmt (vgl. Abb. C-10). Dabei konnte gezeigt werden, daß insbesondere bei geringen Immunisierungsdosen (20µg) nur der synthetische Pr55^{gag} -Expressionsvektor *pc-syngag* geeignet war, konstante und hohe anti-Gag Antikörpertiter (1:1Mio.) in 100% der Versuchstieren zu induzieren. Mit Erhöhung der verabreichten DNA-Dosis auf 100µg pro Versuchstier konnten zwar auch nach 2 bzw. 3-maliger Immunisierung der Vektoren *pc-UTRwtgagRRE*, *pc-UTRwtgagRRE+pc-Rev* und *pc-UTRwtgagCTE* in der Mehrzahl (40-80%), jedoch nicht allen Tieren maximale AK-Titer von bis zu 1:100.000 nachgewiesen werden, dennoch war die humorale Immunantwort geringer als nach Immunisierung von *pc-syngag*. Zudem wurden erhebliche Schwankungen innerhalb der induzierten AK-Titer beobachtet. Ferner wurden zwischen den Konstrukten *pc-UTRwtgagRRE*, *pc-UTRwtgagRRE+pc-Rev* oder *pc-UTRwtgagCTE* keine signifikanten Unterschiede bezüglich der induzierten AK-Titer festgestellt, obwohl die Anzahl positiver Versuchstiere nach Ko-Immunisierung von *pc-UTRwtgagRRE* und *pc-Rev* geringfügig niedriger war, als nach Ko-Immunisierung von *pc-UTRwtgagRRE* bzw. *pc-UTRwtgagCTE* und dem nicht-kodierenden Vektor *pcDNA3.1*. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß in allen Fällen bereits nach der ersten Auffrischimpfung die maximalen AK-Titer induziert worden waren und diese durch eine wiederholte Immunisierung nicht wesentlich gesteigert werden konnten. So war z.B. eine Dosis von 20µg *pc-syngag* Plasmid-DNA ausreichend,

um eine maximale, humorale Immunantwort zu induzieren, während im Gegensatz dazu 100µg der weniger effizienteren Vektoren pc-UTRwtgagRRE, pc-UTRwtgagRRE/Rev und pc-UTRwtgagCTE immunisiert werden mußten, um maximale AK-Titer zu induzieren. Unabhängig von dem jeweiligen Expressionskonstrukt, der Dosis der verabreichten Plasmid-DNA sowie der induzierten, absoluten AK-Titer, induzierte die i.m. Immunisierung von Balb/c-Mäusen eine T_H1-polarisierte Immunantwort ($\text{IgG1} < \text{IgG2a}$ bzw. $\text{IgG1}/\text{IgG2a} < 1$).

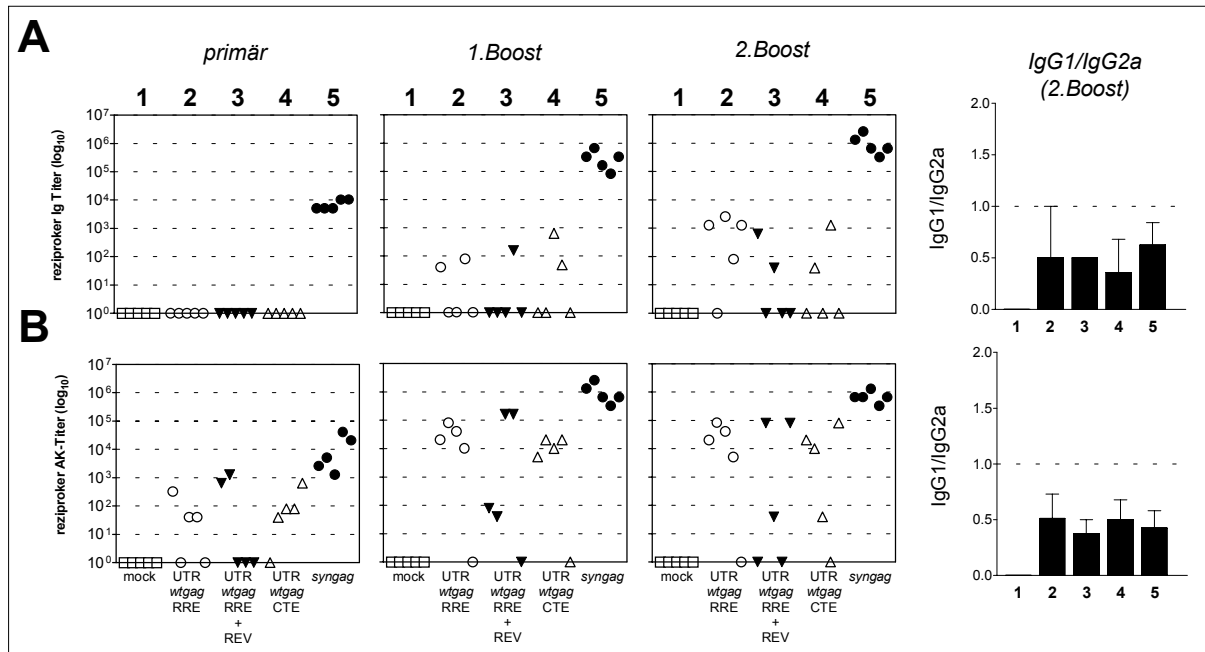


Abbildung C-10 Humorale Immunantwort nach i.m. (tibialis anterior) Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit (A) 20µg bzw. (B) 100µg Gesamt-Plasmid DNA ((1) pcDNA3.1. (mock), (2) pc-UTRwtgagRRE/pcDNA3 (2:1), (3) pc-UTRwtgagRRE/pCsREVsg25GFP (2:1), (4) pc-UTRwtgagCTE/pcDNA3 (2:1) und (5) pc-syngag/pcDNA3 (2:1)). Die Seren wurden 7 Tage nach Primärimmunisierung, 2 Wochen nach der 1. Auffrischimpfung (1.Boost) und 1 Woche nach der dritten Immunisierung (2. Boost) gewonnen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie der AK Isotypen, IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurde mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer \log_{10}) bestimmt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in diesem initialen Immunisierungsexperiment im Balb/c Mausmodell durch eine intramuskulären (tibialis anterior) Verabreichung nackter Plasmid-DNA, die hohe Immunogenität des Kodon-optimierten Pr55^{gag}-Expressionskonstrukts (pc-syngag) im Vergleich zu herkömmlichen (pc-UTR-wtgag-RRE/Rev) bzw. alternativen Pr55^{gag}-Expressionsmodulen (pc-UTR-wtgag-CTE) verdeutlicht werden. Diese hohe Immunogenität ist dadurch gekennzeichnet, daß bereits geringe Mengen an Plasmid-DNA ausreichend waren, um bereits nach der zweiten Immunisierung in allen Versuchstieren maximale Gag-spezifische AK-Titer (1:1Mio.) zu induzieren. Im Vergleich mit den Expressionsversuchen *in vitro* wird deutlich, daß die Immunogenität des entsprechenden Expressionsvektors *in vivo* direkt mit der Expressionstärke des jeweiligen Gens korreliert. In allen Fällen induzierte die i.m. Immunisierung eine T_H1-polarisierte Immunantwort, die auf eine ebenfalls effiziente, zelluläre Immunantwort schließen läßt. Durch die Verwendung des synthetischen gag Gens kann zudem auf die Ko-Expression des viralen, transaktiven Proteins Rev verzichtet werden. Die zusätzlich durch den Verzicht viraler Wildtyp Sequenzen verbundenen Sicherheitsvorteile, bei gleichzeitiger erhöhten Immunogenität machten den Kodon-optimierten Expressionsvektor pc-syngag zu einem attraktiven HIV/AIDS-Vakzinekandidat.

C.3 Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell

Wie bereits in Kapitel C.2 gezeigt werden konnte, induziert eine i.m. Verabreichung nackter pc-syngag Plasmid-DNA eine effiziente T_H1 -polarisierte, Gag-spezifische humorale Immunantwort im Balb/c-Mausmodell. Zur weiteren immunologischen Charakterisierung dieses potentiellen DNA-Vakzine Kandidaten sollten im folgenden nicht nur die humoralen sondern auch die zellulären Parameter im Balb/c-Mausmodell detailliert untersucht werden. Ferner sollten unterschiedliche Immunisierungsrouten (i.m. versus s.k.) und Verabreichungsformen (nackte Plasmid-DNA versus liposomale DNA) hinsichtlich der Effizienz und Eigenschaften der induzierten Immunantwort miteinander verglichen werden. Die Immunogenität der DNA-Vakzine sollte des weiteren der nach Immunisierung mit herkömmlichen, partikulären Pr55^{gag} Proteinantigenen (VLPs) induzierten Immunantwort gegenübergestellt werden.

C.3.1 Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine

C.3.1.1 Dosisabhängigkeit der humoralen Immunantwort

Zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit der humoralen Immunantwort wurden zunächst je 5 Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit unterschiedlichen Mengen des pc-syngag Vektors i.m. (*Tibialis anterior*) immunisiert. Zwei Wochen nach der primären Immunisierung sowie zwei Wochen nach der ersten bzw. eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung wurden die Gag-spezifischen Ig-Titer sowie die Titer der AK-Subtypen, IgG1 und IgG2a, bestimmt (vgl. Abb. C-11). Dabei konnte gezeigt werden, daß die AK-Titer unabhängig von der verabreichten DNA-Dosis durch eine zweite Immunisierung (1.Boost) um das ca. 50 bzw. das 100-fache gesteigert wurden. Eine weitere Auffrischimpfung (2.Boost) hatte dagegen nur eine geringe Steigerung der humoralen Immunantwort zur Folge (Faktor 5-10). Obwohl bereits 20µg Plasmid-DNA ausreichten, um nach der ersten Auffrischimpfung Gag-spezifische Antikörper Titer von ca. 1:80.000 zu induzieren, konnte zum selben Zeitpunkt nach Immunisierung von 50µg DNA bereits die 4-fache (ca. 1:300.000) und nach Immunisierung von 100µg die 9-fache (ca. 1:700.000) Menge Gag-spezifischer Ig Antikörper detektiert werden. Die Verabreichung von mehr als 100µg Plasmid-DNA hatte dagegen keinen nennenswerten Einfluß auf die AK-Titer mehr. Ferner konnte durch die Bestimmung der AK-Subtypen und deren Verhältnisse (IgG1/IgG2a) gezeigt werden, daß zu allen gemessenen Zeitpunkten die induzierte Immunantwort unabhängig von der Menge der verabreichten Plasmid-DNA T_H1 -bzw. in Einzelfällen gemischt T_H1/T_H2 polarisiert war.

C.3.1.2 Humorale und zelluläre Immunantwort

Zur weiteren Untersuchung der Immunogenität der pc-syngag Plasmid-DNA *in vivo* wurden jeweils 10 Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg pc-syngag i.m. (*Tibialis anterior*) immunisiert und die humorale und zelluläre Immunantwort detailliert analysiert (vgl. Abb. C-12). Wie auch in dem vorangegangenen Experiment wurden die absoluten Gag-spezifischer Ig-Titer durch eine zweite Immunisierung um ca. das 50-100-fache sowie durch eine zweite Auffrischimpfung lediglich um das 5-fache gesteigert. Die maximalen AK-Titer nach der dritten Immunisierung betrugen durchschnittlich 1:500.000. In allen Fällen wurde eine gemischte

T_H1/T_H2 polarisierte Immunantwort induziert, die durch identische Titer der AK-Isotypen IgG1 und IgG2a charakterisiert ist.

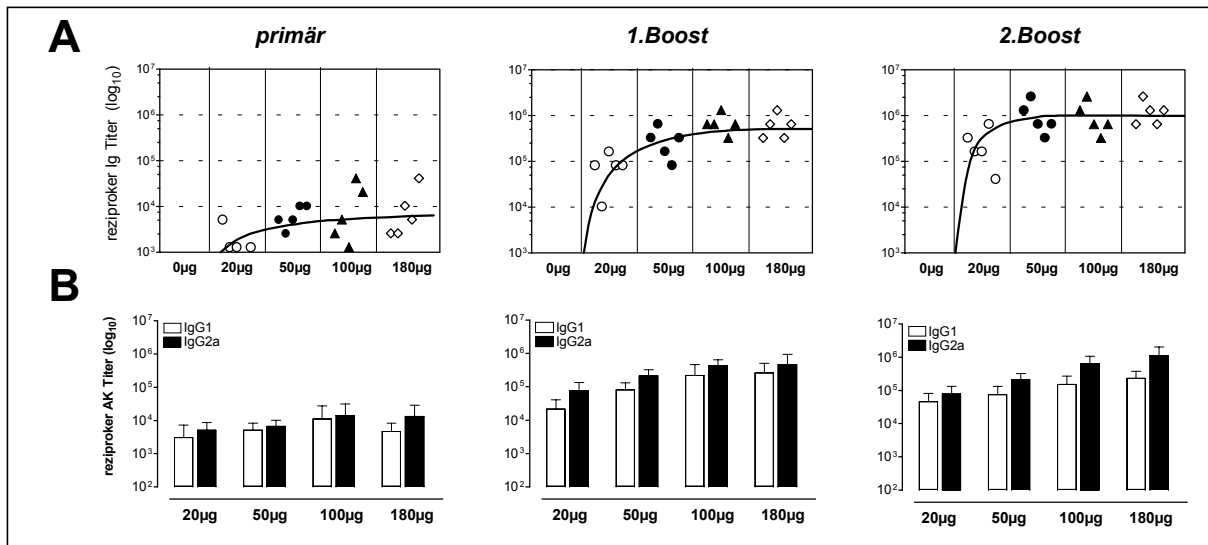


Abbildung C-11 Dosisabhängigkeit der durch i.m. Immunisierung von Balb/c-Mäusen induzierten humoralen Immunantwort. **(A)** Anti-Gag spezifische Ig-Titer 7 Tage nach der Primärimmunisierung, 2 Wochen nach der Auffrischimpfung (1.Boost) und eine Woche nach der dritten Immunisierung (2.Boost) von je 20 µg, 50 µg 100 µg und 180 µg pc-syngag Plasmid-DNA. **(B)** Anti-Gag spezifische IgG1,- und IgG2a-Titer immunisierter, positiver Balb/c-Mäuse.

Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen präpariert, Einzelzellkulturen von Spenozyten gewonnen und die zellulären Parameter nach *in vitro* Restimulation mit spezifischen Antigenen analysiert. Die Bestimmung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellreaktivitäten der Milzzellpopulationen ergab, daß ca. 40% (E:T Ratio: 100:1) der murinen P815 Zielzellen, welche das MHC-Klasse I (H-2K^d) restringierte Peptid A9I^{p24} (AMQMLKETI) auf der Oberfläche präsentierten, von spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkannt und infolgedessen lysiert wurden (vgl. Abb C-12, B). Geringfügig niedrigere ZTL Aktivitäten (ca. 30-35% spezifische Lyse) wurden für ein weiteres MHC-Klasse I (H-2L^d) restringiertes Peptid, E10F^{p24} (EPFRDYVDRF), ermittelt. Diese Lyse war spezifisch für die Peptide A9I^{p24} und E10F^{p24}, da P815 Zellen, die nicht (P815(-)) oder mit einem unspezifischem Peptid (R10I^{V3}) gepulst worden waren, nicht lysiert wurden. Somit wurden durch eine 3-malige i.m. Immunisierung der pc-syngag DNA-Vakzine Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen *in vivo* induziert. Weiterhin wurden die Splenozyten mit verschiedenen Gag-spezifischen Antigenen, wie z.B. Virus-ähnlichen Gag Partikeln (VLPs), rekombinantem p24^{Ka} Antigen oder MHC-Klasse I restringierten Peptiden, *in vitro* restimuliert, und die Freisetzung verschiedener Zytokine in den Überstand mittels ELISA quantitativ bestimmt. Da jedes Zytokin i.d.R. von einem bestimmtem Zelltyp produziert wird, gibt die Zusammensetzung der Zytokine nach *in vitro* Restimulation Aufschluß über die durch die Immunisierung induzierten zellulären Aktivitäten. So sezernieren differenzierte T_H1-Zellen nach *in vitro* Restimulation zum Beispiel große Mengen an IFN-γ und IL-2, während differenzierte T_H2 Zellen IL-5, IL-10, IL-13 und geringe Mengen IL-6 freisetzen. Ferner kann IFN-γ neben T_H1-Zellen ebenfalls von aktivierten CD8⁺ ZTLs, sowie unspezifisch von NK-Zellen sezerniert werden. Restimierte B-Zellen setzen ebenfalls detektierbare Mengen an IL-6 und IL-12 frei, während Antigen-präsentierende Zellen (APZ) eine Vielzahl von Zytokinen, wie z.B. IL-12, IL-6, TNF-α sezernieren. Nach *in vitro* Stimulation der Splenozyten mit VLPs bzw. rekombinantem p24^{Ka} konnte vorwiegend IFN-γ und in vergleichsweise geringen Konzentration die Zytokine IL-6, IL-2 und IL-10, nicht aber IL-12, IL-4 oder IL-5 im Überstand nachgewiesen werden (vgl. Abb. C-12,

C). Nach *in vitro* Stimulation der Zellen mit den MHC-Klasse I restringierten Peptiden A9I^{p24} und E10F^{p24} wurde lediglich IFN- γ detektiert. Anhand dieser Ergebnisse konnte verdeutlicht werden, daß durch eine 3-malige i.m. Immunisierung der pc-syngag DNA-Vakzine vorwiegend eine Gag-spezifische zelluläre T_H1 (IFN- γ , IL-2) und auch eine T_H2 (IL-6, IL-10)-polarisierte Immunantwort *in vivo* induziert worden war.

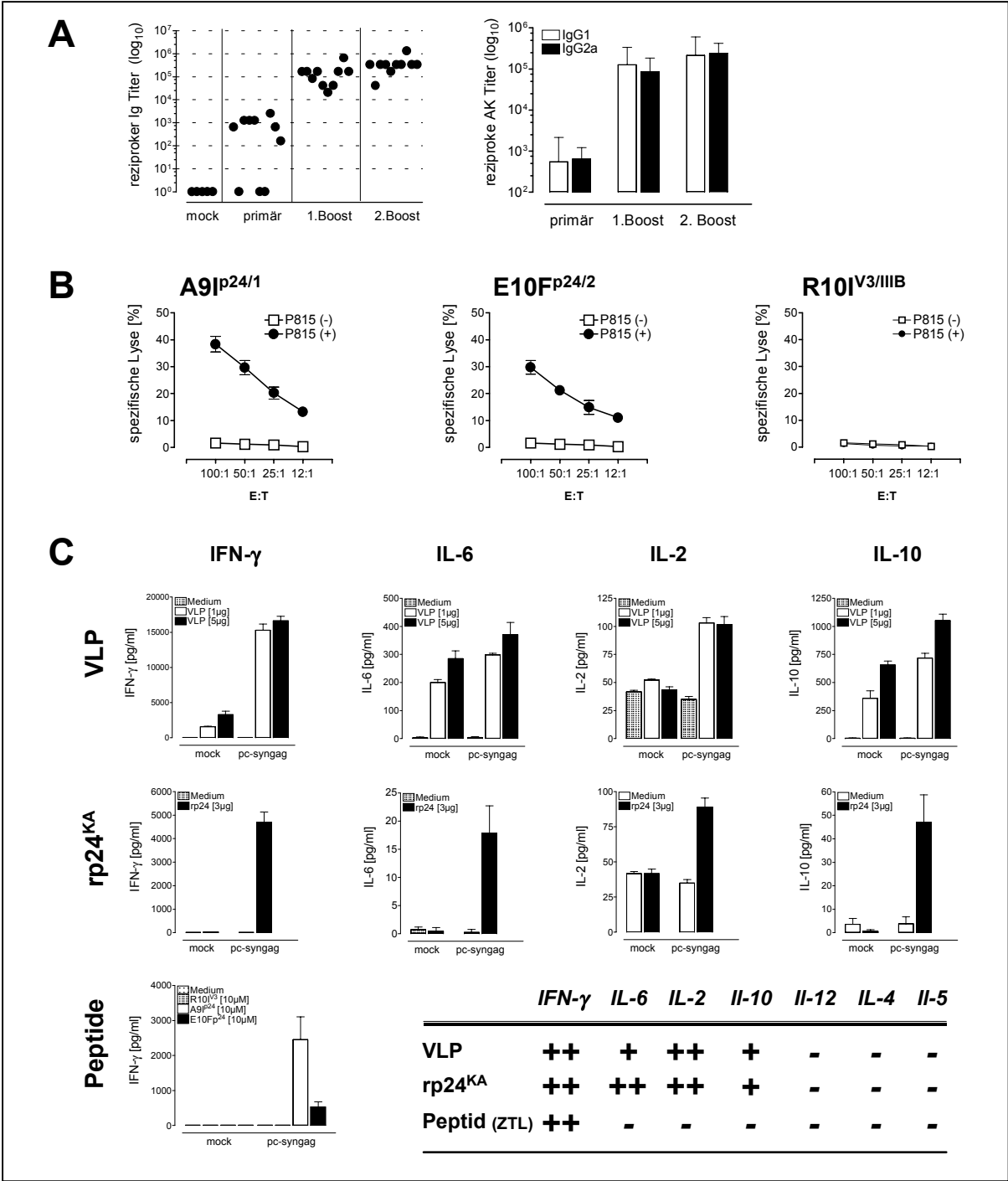


Abbildung C-12. Gag-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort nach 3-maliger i.m. Immunisierung von je 100 μ g pc-syngag Plasmid-DNA. **(A)** Absolute Gag-spezifische Ig-Titer (linke Grafik) bzw. absolute Titer der AK-Isotypen, IgG1 und IgG2a (rechte Grafik), vor (mock) bzw. 7 Tage nach der ersten Immunisierung (primär), 2 Wochen nach der ersten Auffrischimpfung (1.Boost) und eine Woche nach der dritten Immunisierung (2.Boost) **(B)** Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantworten von Milzzellen eine Woche nach der dritten Immunisierung: bestimmt wurden hierbei die spezifische Lyse der mit den Peptiden A9I^{p24/1} (40%), E10F^{p24/1} (30%) und R10I^{V3/IIIb} (0%, Kontrolle) „gepulsten“ P815 Zielzellen im „⁵¹Cr-Release Assay“. **(C)** Quantifizierung der Sekretion von IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-12, IL-4 und IL-5 nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten (48h) mit VLPs (1 μ g bzw. 5 μ g), rekombinantem p24^{KA} (3 μ g) und den ZTL-spezifischen Peptiden A9I^{p24/1}, E10F^{p24/1} und R10I^{V3/IIIb} (10 μ M).

C.3.1.3 Dauer der induzierten Immunantwort

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Dauer der induzierten Immunantwort untersucht werden. Dazu wurden je 5 Balb/c Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert. Anschließend wurde der zeitliche Verlauf der induzierten Gag-spezifischen AK-Titer sowie die zellulären T-Zell Reaktivitäten bis zu 3 Monaten nach der letzten Immunisierung analysiert (vgl. Abb. C-13). Dabei konnte gezeigt werden, daß nach 3-maliger, initialer Immunisierung die induzierten Gag-spezifischen AK-Titer über den gemessenen Zeitraum von 3 Monaten relativ konstant waren. Ebenso konnten in den Milzen immunisierter Mäuse Gag-spezifische, reaktive CD8⁺ zytotoxische T-Zellen detektiert werden (25%). Aufgrund der ermittelten Verhältnisse der AK-Subtypen (IgG1:IgG2a) kann man schließen, daß sich die durch i.m. Injektion von nackter Plasmid-DNA induzierte T_H1-polarisierte Immunantwort über die Zeit deutlicher manifestiert.

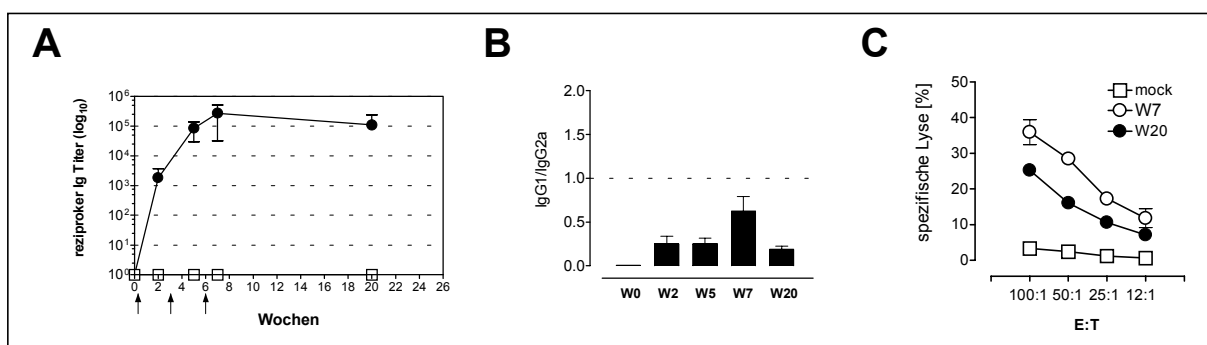


Abbildung C-13 Dauer der durch i.m. (*tibialis anterior*) DNA-Vakzinierung von 50µg pc-syngag induzierten Gag-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort. **(A)** Absolute Gag-spezifische Ig-Titer von nicht immunisierten (□) und mit pc-syngag immunisierten Balb/c-Mäusen (●) in Woche 0, 2, 5, 7 und 20 nach den einzelnen Immunisierungen (↑). **(B)** Verhältnis der absoluten Gag-spezifischen Titer der AK-Isotypen (IgG1:IgG2a) vor (W0) bzw. zwei Wochen nach der ersten Immunisierung (W2), 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung (W5) sowie eine Woche (W7) bzw. 3 Monate nach der dritten Immunisierung (W20). **(C)** CD8⁺ ZTL-spezifische Lyse von mit MHC-Klasse I restrinigertem Peptid A9P^{p24/1} „gepulsten“ P815 Zielzellen eine Woche bzw. 13 Wochen (ca. 3 Monate) nach der dritten Immunisierung.

C.3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, daß bereits geringe Mengen (z.B. 20µg) der Kodon-optimierten pc-syngag Plasmid-DNA ausreichen, um nach intramuskulärer Verabreichung (*tibialis anterior*) effiziente Immunantworten zu induzieren. Dabei korrelierte bis zu einer Dosis von ca. 100µg Plasmid-DNA die immunisierte Menge an DNA mit der Stärke der induzierten Immunantwort *in vivo*. Die Immunisierung von pc-syngag induzierte dabei sowohl eine starke humorale als auch zelluläre Immunantwort, die durch hohe Mengen Gag-spezifischer Antikörper-Titer im Serum (maximaler Ig-Titer von 1:1Mio) sowie Gag-spezifische Reaktivitäten von CD4⁺ T-Helfer Lymphozyten und CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen (30-40% Lyse bei einer E:T Ratio von 100:1) in der Milz immunisierter Balb/c-Mäuse charakterisiert ist. Bereits eine einmalige Auffrischimpfung 3 Wochen nach der Primärimmunisierung war ausreichend, um eine maximale Immunantwort zu erzielen. Ferner konnte gezeigt werden, daß die durch 3-malige DNA-Immunisierung induzierte humorale, als auch die zellulären Immunantwort über einen Zeitraum von mehreren Monaten detektierbar und relativ stabil waren.

C.3.2 Einfluß interner CpG-Motive auf die Immunogenität der syngag DNA-Vakzine

Bereits in den 80-iger Jahren konnte gezeigt werden, daß bakterielle DNA in Vertebraten vielfältige immunstimulatorische Reaktionen hervorrufen kann (Messina *et al.*, 1991). Diese immunstimulatorischen Eigenschaften wurden auf unmethylierte CpG Sequenzmotive (5'-X-Pur-Pur-CpG-Pyr-Pyr-X-3') zurückgeführt (Krieg *et al.*, 1996, Klinman *et al.*, 1996). Durch die Adaption des Kodongebrauchs des HI-viralen gag Gens an das von hochexprimierter Säugetiergene (*syngag*) wurde auch der Anteil von G/C Dinukleotiden, welche in Prokaryonten mit einer statistischen Häufigkeit von $1/16$ auftreten, in Säugetierzellen allerdings stark unterrepräsentiert sind, um ca. 30% erhöht. Dadurch würden potentielle, immunstimulatorische CpG-Motive generiert, die wesentlich zur Immunogenität der pc-*syngag* DNA-Vakzine beitragen könnten. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde im Rahmen der Diplomarbeit von S. Steck (1999, IMMH Regensburg) mittels *in vitro* Mutagenese ein vergleichbares Pr55^{gag} exprimierendes Gen hergestellt, in dem alle CpG-Motive durch stille Nukleotidmutationen zersört wurden (pc-*syngag*ΔCpG). In den nachfolgenden Experimenten sollte die Expression *in vitro* wie auch die immunogenen Eigenschaften der pc-*syngag* und pc-*syngag*ΔCpG Plasmid-DNA im Mausmodell analysiert und untereinander verglichen werden (vgl. Abb. C-14).

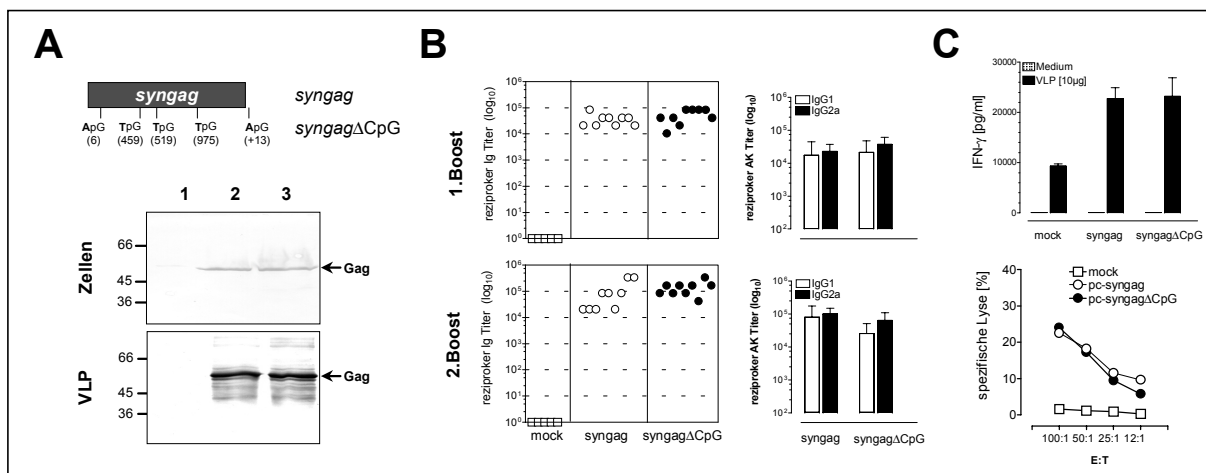


Abbildung C-14. Einfluß interner CpG-Motive innerhalb der kodierenden Sequenz von pc-*syngag* auf die Expression *in vitro* und die Immunogenität *in vivo* (A) Gag Expression und Freisetzung von Pr55^{gag}-Partikeln 36h nach Transfektion der murinen Zelllinie C₂C₁₂ mit (1) pcDNA.3, (2) pc-*syngag* und (3) pc-*syngag*ΔCpG. Je 100µg der Zellysate bzw. 1/2 Vol. der aus dem Überstand (10ml) aufgereinigten Pr55^{gag}-VLPs wurden über eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot mit p24/55-spezifischen Antikörpern (16/4/2, 13/5) detektiert. (B) Absolute Gag-spezifische Ig-Titer (linke Grafiken) und AK-Titer der Isotypen IgG1 und IgG2a (rechte Grafiken) 2 Wochen nach der zweiten (1. Boost) bzw. einer Woche nach der dritten (2. Boost) i.m. Immunisierung (Tibialis anterior) von je 80µg pcDNA.3 (□), pc-*syngag* (○) und pc-*syngag*ΔCpG (●). (C) IFN-γ Sekretion von mit 10µg VLPs *in vitro* restimulierten Splenozyten (obere Grafik) sowie spezifische Lyse von mit A9P^{24/1} „gepulsten“ P815 Zellen durch reaktive zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (untere Grafik) eine Woche nach der dritten i.m. Immunisierung.

Nach Transfektion der murinen Myoblastenzelllinie C₂C₁₂ mit pc-*syngag* bzw. pc-*syngag*ΔCpG wurden sowohl identische Gag Expressionsraten als auch identische Mengen an in den Überstand freigesetzten Virus-ähnlicher Pr55^{gag}-Partikeln nachgewiesen. Ferner konnte im Balb/c-Tiermodell gezeigt werden, daß sich nach 3-maliger i.m. Immunisierung von je 80µg Plasmid-DNA im Abstand von 3 Wochen weder die absoluten Gag-spezifischen Antikörper Titer (1:140.000), das Verhältnis der Antikörper-Isotypen (IgG1 < IgG2a), die Menge des nach *in vitro* Restimulation von Splenozyten freigesetzten Zytokins IFN-γ (23ng/ml), als auch die induzierte zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort (23%) wesentlich voneinander unterscheiden. Aus diesem

Ergebnis läßt sich schließen, daß die CpG-Motive innerhalb des gag kodierenden Bereichs des pc-syngag Plasmids keinen Einfluß auf die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine besitzen (Deml *et al.*, 2001).

C.3.3 Vergleich unterschiedlicher Immunisierungsrouten und Verabreichungsformen der syngag DNA-Vakzine

C.3.3.1 Injektion der Plasmid-DNA in unterschiedliches Muskelgewebe

In einem initialen Versuch, wurden 3x im Abstand von 3 Wochen je 50µg bzw. 100µg der pc-syngag Plasmid-DNA in unterschiedliches Muskelgewebe injiziert und die induzierten Gag-spezifischen Ig-Titer nach der ersten und zweiten Auffrischimpfung analysiert und verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß nach i.m. Verabreichung der Plasmid-DNA in den Oberschenkelmuskel (*quadriceps sp.*) die Antikörper Titer erheblich streuten und im Vergleich zu der Injektion der Plasmid DNA in den Schienbeinmuskel (*tibialis anterior*, TA) drastisch reduziert waren. So waren z.B. die absoluten AK-Titer nach Injektion von je 50µg in den TA Muskel um den Faktor 1.000 (1. Boost) bzw. 100 (2.Boost) höher, als nach Injektion der gleichen Menge DNA in den hinteren Oberschenkelmuskel. Dennoch wurde unabhängig von der Immunisierungsrouten und der Dosis der verabreichten DNA eine T_H1-polarisierte Immunantwort induziert (nicht gezeigt).

C.3.3.2 Subkutane (s.k.) versus intramuskuläre (i.m.) DNA-Immunisierung

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die subkutane (s.k.) mit der intramuskulären (i.m.) Applikation (*tibialis anterior*) nackter Plasmid-DNA verglichen. Dazu wurden die Versuchstiere 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA s.k. bzw. i.m. immunisiert und die Gag-spezifische humorale sowie zelluläre Immunantwort zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert (vgl. Abb. C-15). Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die durch s.k. und i.m. DNA-Immunisierung induzierten Gag-spezifischen humoralen Immunantworten nur geringfügig unterscheiden. So konnte z.B. beobachtet werden, daß die s.k. im Vergleich zur i.m. Immunisierung eine leicht verzögerte humorale Immunantwort induziert, obwohl die maximalen Gag-spezifischen Ig-Titer nach der dritten Immunisierung identisch waren. So wurden z.B. nach der s.k. Primärimmunisierung lediglich in 2 von 5 Mäusen (20%) spezifische Antikörper detektiert, während bei der i.m. Immunisierung in bereits 4 von 5 Tieren (80%) eine effiziente humorale Immunantwort induziert worden war. Dennoch induzierte sowohl die s.k. Immunisierung als auch die i.m. Immunisierung nackter Plasmid-DNA eine gemischte T_H1/T_H2,- bzw. vorwiegend T_H1-polarisierte Immunantwort (IgG1 < IgG2a). Ferner konnten keine gravierenden Unterschiede in der Induktion reaktiver A9I^{p24}-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten *in vivo* detektiert werden, obwohl in den aus s.k. immunisierten Mäusen isolierten Splenozyten eine geringfügig höhere ZTL-spezifische Lyse (46%) als in den i.m. immunisierten Tieren, (41%) gemessen wurde. Erstaunlicherweise, war jedoch die Menge an freigesetztem IFN-γ nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit verschiedenen Gag-spezifischen Antigenen nach s.k. DNA-Immunisierung deutlich reduziert (Faktor 4-5).

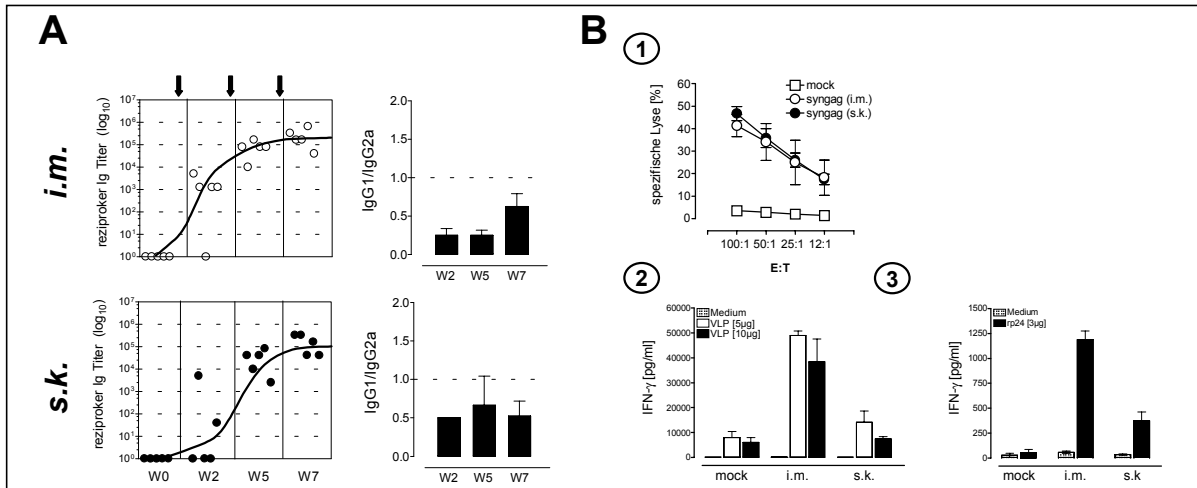


Abbildung C-15 Vergleich von s.k. und i.m. DNA-Immunisierung. Weibliche Balb/c-Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 50 μ g pc-syngag Plasmid-DNA i.m. (tibialis anterior, ○) bzw. subkutan (s.k.) am Schwanzansatz (●) immunisiert. (A) Absolute Gag-spezifische Ig-Titer (linke Grafiken) sowie das Verhältnis der AK-Isotypen (IgG1/IgG2a) vor (W0) bzw. 7 Tage nach der primären (W2), 2 Wochen nach der zweiten (W5) sowie eine Woche nach der dritten (W7) Immunisierung (↓). (B) Gag-spezifische zelluläre Immunantwort eine Woche nach der dritten Immunisierung: (1) Gag-spezifische Lyse von mit MHC-Klasse I restrinigertem Peptid A91^{p24/1} „gepulsten“ P815 Zellen durch reaktive zytotoxische CD8⁺ T-Zellen der Milz, (2) IFN- γ Sekretion von mit Pr55^{gag}-VLPs in vitro restimulierten Splenozyten, (3) IFN- γ Sekretion von mit rekombinantem p24^{KA} in vitro restimulierten Splenozyten. (mock = mit pC-HBsAg (Schirmbeck R., Ulm) immunisierte Balb/c-Mäuse)

C.3.3.3 Immunisierung „nackter“ Plasmid-DNA versus Lipid-komplexierter DNA (Liposomen)

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluß unterschiedlicher Verabreichungsformen in Kombination mit unterschiedlichen Immunisierungsrouten auf die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine untersucht werden. Hierfür wurde die Applikation der „nackten“ DNA in gepufferter Salzlösung (PBS) mit der liposomalen Immunisierung, bei der die Plasmid-DNA mit DOTAP-Liposomen sowie dem Polykation Protamin komplexiert wurde, verglichen. In bislang drei unabhängigen Studien im Balb/c-Mausmodell wurde die Effizienz der liposomalen Immunisierung getestet und die Formulierung der Liposomen weiterentwickelt und verbessert. Die Versuche, deren gegenwärtigen Ergebnisse in diesem Kapitel zusammengefaßt sind, wurden in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. K.Überla (Universität Bochum) durchgeführt, der für die Entwicklung und Bereitstellung der Liposomen verantwortlich war.

In einem der ersten Experimente konnte gezeigt werden, daß eine 3-malige liposomale i.v. Immunisierung, im Gegensatz zur liposomalen i.d. bzw. i.m. Immunisierung, bei denen lediglich in 2 von 8 Mäusen (25%) Gag-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten, in allen Versuchstieren effiziente und konsistente Gag-spezifische AK-Titer induzierte. Dennoch waren die maximale Titer der liposomalen i.v. Immunisierung um den Faktor 100 niedriger als eine entsprechende i.m. Immunisierung nackter Plasmid-DNA. Nach veränderter Formulierung der Lipid/DNA-Komplexe wurden abermals Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen auf unterschiedlichem Wege immunisiert und die induzierten Immunantworten analysiert. In diesem Versuchsansatz konnten lediglich bei denjenigen Versuchstieren Gag-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die i.m. mit nackter Plasmid-DNA immunisiert worden waren. Dementsprechend konnte auch nur in i.m. mit Plasmid-DNA immunisierten Mäusen effiziente, zytotoxische CD8⁺ T-Zell Antworten (43% spezifische Lyse bei einer E:T Ratio von 50:1) in den

Milzzellen detektiert werden. Dennoch wurde eine schwache, jedoch detektierbare Gag-spezifische, lytische Aktivität in den Splenozytenpopulation von liposomal i.v. immunisierten Tieren nachgewiesen (13%). Auch nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit unterschiedlichen Gag-spezifischen Antigenen konnten lediglich in denjenigen Mäusen, die i.m. mit nackter Plasmid-DNA oder i.v. mit liposomaler DNA immunisiert worden waren, die Freisetzung von IFN- γ detektiert werden.

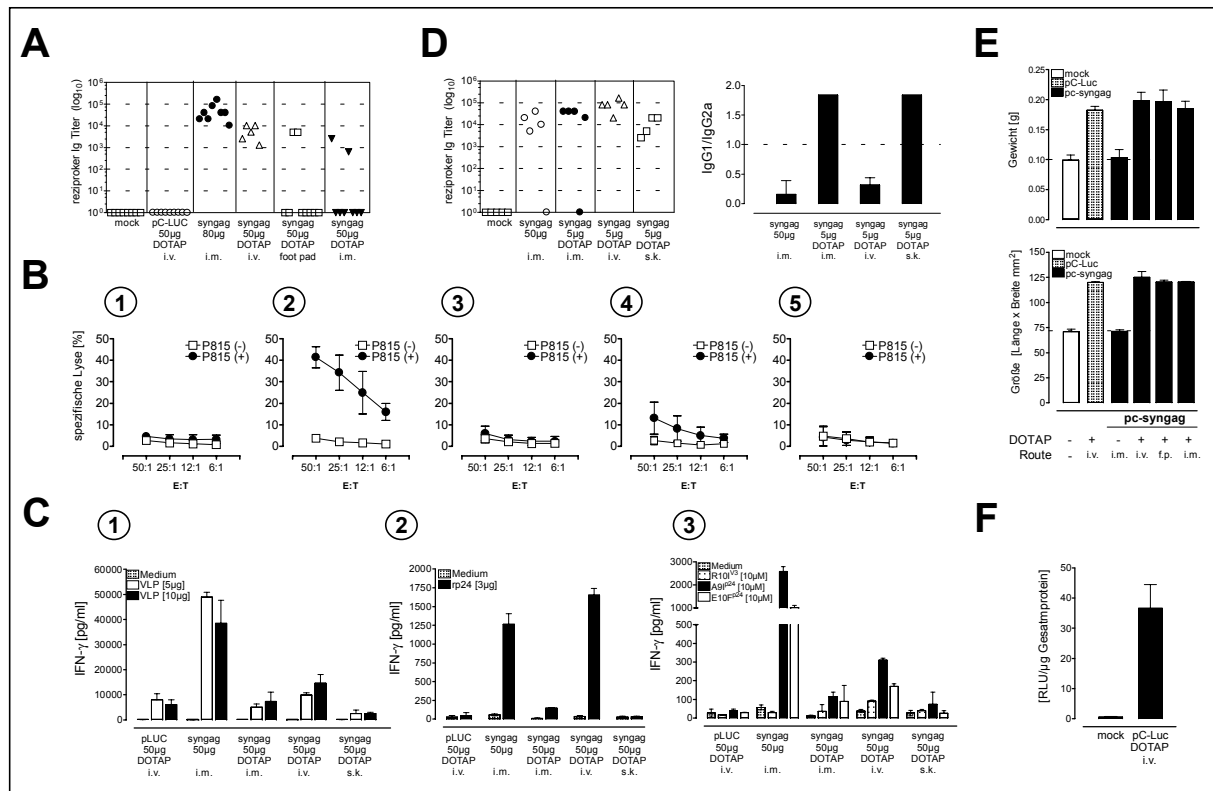


Abbildung C-16 Vergleich der Immunogenität von „nackter“ Plasmid-DNA und liposomaler DNA-Immunisierung. **(A)** Absolute Gag-spezifische Ig-Titer nach 3-maliger Immunisierung mit den angegebenen Mengen, Applikationsformen und Routen der pc-syngag DNA-Immunisierung (Immunisierungsstudie I). **(B)** Spezifische Lyse von mit MHC-Klasse I restrinigtem Peptid A9P^{24/1} „gepulsten“ P815 Zielzellen durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen der Milz von mit **(1)** pC-Luc, **(2)** mit pc-syngag/i.m., **(3)** mit liposomaler pc-syngag/i.m., **(4)** mit liposomaler pc-syngag/i.v. und **(5)** mit liposomaler pc-syngag/s.k. immunisierten Balb/c-Mäusen (Immunisierungsstudie II). **(C)** IFN- γ Sekretion der *in vitro* restimulierten Splenozyten von mit **(1)** Pr55^{gag}-VLPs, **(2)** mit rekombinantem p24^{KA} und **(3)** mit MHC-I restringierten Peptiden A9P^{24/1}, E10P^{24/1} und R10P^{13/IIIb} (Immunisierungsstudie II). **(D)** Absolute Gag-spezifische Ig-Titer (linke Grafik) und das Verhältnis der AK-Isotypen (IgG1/IgG2a) (rechte Grafik) nach 3-maliger Immunisierung mit den angegebenen Mengen, Applikationsformen und Routen der pc-syngag DNA-Immunisierung (Immunisierungsstudie III). **(E)** Nach 3-maliger i.m., i.v. oder i.d. (footpad) Immunisierung von je 50µg nackter bzw. liposomaler pC-Luc bzw. pc-syngag (schwarze Balken) Plasmid-DNA wurde die Größe und das Gewicht der entnommenen Milzen eine Woche nach der dritten Vakzinierung bestimmt. **(F)** 24h nach einer einmaligen i.v. Injektion von 50µg liposomaler pC-Luc Plasmid-DNA (Luziferase-Reporter) wurde die Luciferase Expression (RLU/µg Gesamtprotein) in den Lungen der immunisierten Balb/c-Mäuse bestimmt. (mock = mit pC-Luc immunisierte Balb/c-Mäuse)

Nach erneuter Verbesserung konnte in einer dritten Immunisierungsstudie letztendlich die liposomale Formulierung soweit optimiert werden, daß bereits 5µg Plasmid-DNA, komplexiert mit DOTAP/Protamin ausreichten, um durchschnittlich zumindest dieselben bzw. bereits um den Faktor 4 höhere Antikörper-Titer zu induzieren, wie die 10-fache Menge (50µg) i.m. (*tibialis anterior*) injizierter, nackter Plasmid-DNA. Die i.v. Applikation (1:86.000) erzielte im Vergleich zur i.m. (1:36.000) bzw. s.k. Immunisierung (1:12.000) von liposomaler DNA die höchsten, absoluten Gag-spezifischen AK-Titer. Zudem konnte gezeigt werden, daß die i.m. und s.k. Immunisierung liposomaler DNA eine T_H2-polarisierte Immunantwort (IgG1:IgG2a > 1) induzierte, während im Gegensatz dazu sowohl die liposomale i.v. Immunisierung als auch die i.m. Immunisierung

nackter Plasmid-DNA eine T_H1 -polarisierte Immunantwort ($IgG1:IgG2a > 1$) generierte. Interessanterweise konnte zusätzlich beobachtet werden, daß nach wiederholter Verabreichung liposomaler DNA-Komplexe, nicht aber nach Immunisierung von nackter Plasmid-DNA, die Milzen der immunisierten Tiere das doppelte Gewicht besaßen und sich um das 2-fache vergrößert hatten. Im Zusammenhang mit der erhöhten Sterblichkeitsrate immunisierter Tiere, deutet dies auf mögliche toxische Eigenschaften der Liposomen hin. Weitere Immunisierungsstudien, in denen die immunogenen Eigenschaften der liposomal verabreichten DNA detailliert charakterisiert werden soll, sind bereits in Planung.

C.3.3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde deutlich, daß eine i.m. DNA-Immunisierung der hinteren Schienbeinmuskeln (*tibialis anterior*) narkotisierter Balb/c-Mäuse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, Konsistenz und Effizienz der induzierten Immunantwort besser geeignet ist, als eine i.m. Immunisierung in den Oberschenkelmuskel (*quadriceps. sp.*). Zudem konnte gezeigt werden, daß das Auftreten Gag-spezifischer AK-Titer bei einer s.k. DNA-Immunisierung gegenüber der i.m. Immunisierung leicht verzögert ist. Dennoch waren die absoluten Gag-spezifischen Ig-Titer sowie die p24-spezifischen $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellreaktivitäten nach 3-maliger Immunisierung identisch. Mit schrittweise optimierten Verfahrenstechniken konnte ferner gezeigt werden, daß, weitgehend unabhängig von der Immunisierungsrouten (i.v., i.m., s.k.), bei einer Immunisierung von mit Liposomen (DOTAP/Protamin) komplexierter Plasmid-DNA, im Vergleich zur i.m. Immunisierung nackter Plasmid-DNA in gepufferter Salzlösung, bereits eine 10-fach geringere Menge DNA ausreicht, um eine ebenso effiziente Gag-spezifische humorale Immunantwort *in vivo* zu induzieren.

C.3.4 DNA-Vakzine versus Immunisierung Virus-ähnlicher Partikel

Das HI-virale Pr55^{gag} Polyprotein beinhaltet allein alle Eigenschaften, um partikuläre Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel von der Zellmembran abzuschnüren und in den extrazellulären Raum freizusetzen (Brand *et al.*, 1995, Wagner *et al.*, 1994). In verschiedenen Tiermodellen konnte darüberhinaus die hoch-immunogenen Eigenschaften dieser exogen verabreichten, partikulären Antigene, charakterisiert durch die Induktion effizienter humoraler als auch zellulärer Immunantworten, demonstriert werden (Deml *et al.* 1997, Notka *et al.* 1999, Kong *et al.*, 1999, Luo *et al.*, 1992, Rovinski *et al.* 1992). Zusätzlich konnten ausgewählte immunogene und konservierte Domänen viraler Antigene, wie z.B. die HI-virale V3-Schleife, an verschiedenen Stellen zusätzlich inseriert werden ohne die Ausbildung und Freisetzung von VLPs zu behindern (Wagner *et al.* 1994). Die hohe und zugleich leichte Expression in mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen, sowie die schnelle Aufreinigung großer Mengen der Lipoproteinpartikel aus dem Zellkulturüberstand sind ideale Voraussetzungen für einen potentiellen HIV/AIDS-Impfstoffkandidaten. In den folgenden Versuchen sollte die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine mit der der Pr55^{gag}-Virus-ähnlichen Partikel (VLPs) im Balb/c-Mausmodell kritisch miteinander verglichen werden.

C.3.4.1 Vergleichende „DNA-Prime/Protein-Boost“-Strategien

Zum Vergleich der unterschiedlichen Immunisierungsstrategien wurden die Balb/c-Mäuse entweder i.m. (*quadriceps sp.*) mit je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA oder s.k. mit je 10µg Pr55^{gag}-

VLPs prä-immunisiert. Die zweite bzw. dritte Immunisierung erfolgte entweder wiederum mit Plasmid-DNA oder alternativ mit Pr55^{gag}-VLPs, so daß unterschiedliche „Prime/Boost“-Strategien getestet und die induzierten Gag-spezifischen AK-Titer miteinander verglichen werden konnten (vgl. Abb. C-17).

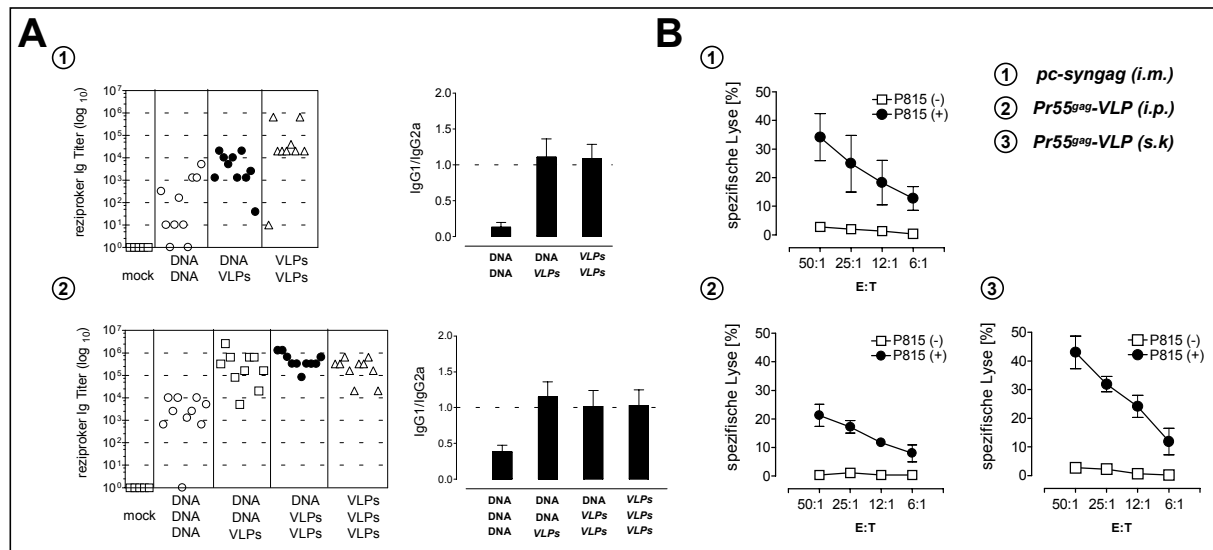


Abbildung C-17. Gag-spezifische Immunantworten nach i.m. DNA-Vakzinierung, s.k. Immunisierung mit Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikeln (VLPs) und kombinierten „Prime/Boost“-Strategien. **(A)** Weibliche Balb/c-Mäuse wurden mit je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA (i.m., Quadriceps) bzw. je 10µg VLPs (s.k.) primär immunisiert. Nachfolgende Immunisierungen erfolgten wie in der Grafik angegebenen (absteigend). Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Titer (linke Grafiken) sowie das Verhältnis der AK-Isotypen (IgG1/IgG2a) (rechte Grafiken) wurden nach **(1)** zwei bzw. **(2)** drei Immunisierungen bestimmt. **(B)** CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort (Milz) gegen mit dem MHC-Klasse I restringiertem Peptid A9P^{24/1} „gepulsten“ P815 Zielzellen von **(1)** mit je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA i.m. (Tibialis anterior), **(2)** mit 5µg Pr55^{gag}-VLPs i.p. und **(3)** mit je 100µg Pr55^{gag}-VLPs s.k. am Schwanzansatz immunisierten Balb/c-Mäusen eine Woche nach der dritten Immunisierung. (mock = nicht immunisierte Versuchstiere)

Nach 3-maliger Immunisierung der Versuchstiere im Abstand von 3 Wochen mit 50µg der pc-syngag Plasmid-DNA, wurden absolute Gag-spezifische Ig-Titer von durchschnittlich 1:5.000 und maximal von ca. 1:10.000 detektiert. Vergleichbare Titer (ca. 1:8.000) wurden allerdings bereits nach einer einmaligen i.m. DNA-Immunisierung und einer darauffolgenden s.k. Immunisierung mit Pr55^{gag}-VLPs erzielt. Darüberhinaus konnte eine 2-malige s.k. Immunisierung von Pr55^{gag}-VLPs um den Faktor 15-30 höhere durchschnittliche Gag-spezifische AK-Titer von 1:150.000 (maximaler Titer: 1:500.000) induzieren. Unabhängig von der Art der vorausgegangenen Immunisierungen, konnten nach einer dritten Applikation von Pr55^{gag}-VLPs eine im Vergleich zu einer 3-maligen DNA-Immunisierung um den Faktor 100 erhöhte Gag-spezifische humorale Immunantwort (1:500.000) detektiert werden. Während die i.m. DNA-Immunisierung eine deutliche T_H1-polarisierte Immunantwort induzierte, wurden nach s.k. Immunisierung von Pr55^{gag}-VLPs sowie auch bei allen „DNA-Prime/VLP-Boost“-Immunisierungsstrategien eine gemischte T_H1/T_H2-polarisierte Immunantwort detektiert. Obwohl in diesem experimentellen Ansatz keine zellulären Immunparameter untersucht wurden, konnten in voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden, daß sowohl die i.m. DNA-Immunisierung als auch die s.k. Immunisierung von Pr55^{gag}-VLPs effiziente und zytotoxische CD8⁺-T Zellantworten *in vivo* induziert.

C.3.4.2 Immunstimulatorische Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vitro*

In dem folgenden Versuch wurden die immunstimulatorischen Eigenschaften der Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel *in vitro* untersucht. Nach *in vitro* Stimulation von verschiedenen Splenozytenkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pr55^{gag}-VLPs (vgl. Abb. C-18), konnte gezeigt werden, daß „naive“ Milzzellen, d.h. aus nicht mit Gag-Antigenen spezifisch „geprägten“ Versuchstieren stammenden Splenozyten, bereits bei geringen Mengen von Pr55^{gag}-VLPs (< 1 µg) unspezifisch die pro-inflammatorischen Zytokine IFN-γ, IL-6, IL-12, und IL-2 sezernierten. Zudem setzten diejenigen Splenozytenkulturen, welche aus nicht-immunisierten Versuchstieren isoliert worden waren, ungleich größere IFN-γ, IL-6 und IL-12 frei, als diejenigen, die aus unspezifisch „geprägten“, d.h. mit für das HBsAg von HBV (Hepatis B Virus) kodierender Plasmid-DNA (pCI/S oder pCI-HBsAg) immunisierten Mäuse stammten. Die Freisetzung von IL-12 war nach Stimulation mit Pr55^{gag}-VLPs i.d.R. in „ungeprägten“, nicht-immunisierten Tieren höher, wie in unspezifisch „geprägten“ bzw. spezifisch „geprägten“ Versuchstieren.

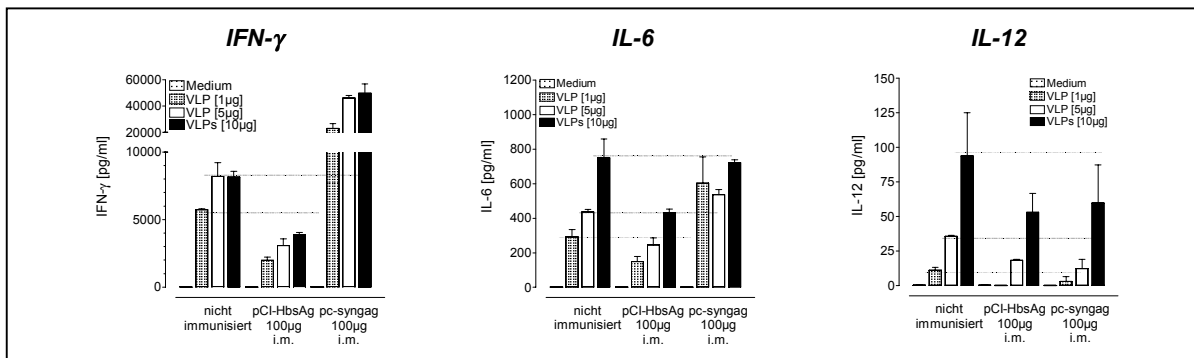


Abbildung C-18 Immunstimulatorische Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vitro*. Die aus der Milz von nicht immunisierten („ungeprägt“), je 3x mit je 100µg pCI-HBsAg (unspezifisch „geprägt“) bzw. je 3x mit 100µg pc-syngag (spezifisch „geprägt“) immunisierten Balb/c-Mäusen isolierten Splenozyten, wurden eine Woche nach der dritten Immunisierung mit der angegebenen Menge an Pr55^{gag}-VLPs *in vitro* (re-)stimuliert und die Menge an freigesetztem IFN-γ, IL-6, IL-12 sowie IL-2, IL-10, IL-4 und IL-5 (nicht gezeigt) im ELISA quantifiziert.

C.3.4.3 Immunstimulatorische Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vivo*

Um die immunstimulatorischen und möglicherweise adjuvierenden Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vivo* zu untersuchen, wurden Balb/c Mäuse i.p. 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 5µg des gereinigten CD-Proteinfragmentes (12kDa) des E-Hüllproteins des Gelbfiebervirus 17D (V.Reuck, Dissertation 2000, RKI Berlin) mit oder ohne 5µg Pr55^{gag}-VLPs bzw. analog aufgereinigter, und UV-inaktiverter Partikel („Baculo-wt“) aus mit Wildtyp Baculovirus infizierten Insektenzellkulturen immunisiert. Nach der dritten Immunisierung wurden die absoluten CD-, Baculo-, und Gag-spezifischen Antikörper Titer (Ig) bestimmt (vgl. Abb. C-19, A). Dabei konnte gezeigt werden, durch die CD-spezifischen AK-Titer (1:17.000) durch Ko-Immunisierung mit Pr55^{gag}-VLPs um das 4-fache (1:70.000), und mit „Baculo-wt“ um das 8-fache (1:140.000) gesteigert wurden. Zudem wurden in mit Baculo-wt immunisierten Tieren durchschnittlich um den Faktor 2 höhere Baculo-spezifische AK-Titer (1:330.000) nachgewiesen als nach Immunisierung mit Pr55^{gag}-VLPs (1/140.000). Ferner wurde die nach Immunisierung mit dem CD-Peptid beobachtete, eindeutige T_H2-polarisierte Immunantwort durch die Ko-Verabreichung mit Pr55^{gag}-VLPs bzw. „Baculo-wt“ in eine T_H1,- bzw. eine gemischte T_H1/T_H2-polarisierte Immunantwort verändert („T_H2→T_H1 Shift“). Aufgrund der nahezu identischen immunstimulatorischen Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs und der Baculo-wt Präparation *in vivo*

wurden des weiteren nach möglichen, gemeinsamen Proteinkomponenten gesucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß das Baculovirus-spezifische Hüllprotein gp64, dessen immunstimulatorischen Eigenschaften bekannt sind (Gronowski *et al.*, 1999), nicht nur in den Präparationen von mit wt-Baculovirus infizierten Insektenzellen zu finden ist, sondern auch in den Pr55^{gag}-VLP Präparationen (vgl Abb. C-19, B). Unklar ist bislang, ob das Membranprotein gp64 ein integrierter Bestandteil der Pr55^{gag}-VLPs ist, oder ob die Pr55^{gag}-Präparationen mit rekombinanten Baculoviren verunreinigt sind.

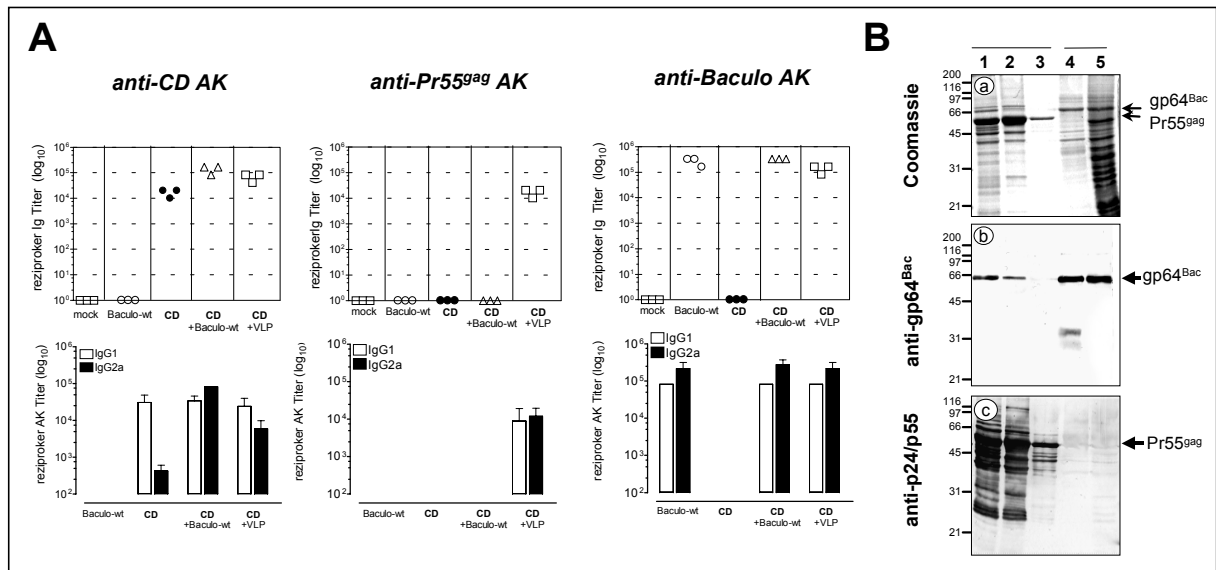


Abbildung C-19 Immunstimulatorische und adjuvierende Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs in vivo. **(A)** Absolute CD-, Baculo-, bzw. Gag-spezifische Ig-Titer (obere Grafiken) sowie CD-, Baculo-, bzw. Gag-spezifische IgG1-, bzw. IgG2a-Titer (untere Grafiken) von immunisierten Balb/c-Mäusen eine Woche nach 3-maliger i.p Applikation von je 5µg des Hüllproteinfragment CD (Gelbsiebervirus 17D) mit bzw. ohne Ko-Verabreichung von je 5µg Pr55^{gag}-VLPs bzw. aus analog mit Wildtyp-Baculovirus infizierten Insektenzellen aufgereinigten Partikel (Baculo-wt) **(B)** Je 10µg **(1)** B1-VLPs (Pr55^{gag}) und **(2)** B4-VLPs (Pr55^{gag}V3), **(3)** 1µg aufgereinigtes 55kDa Gag Protein sowie **(4)** je 50µg eines analog zu Pr55^{gag}-VLPs aufgereinigten Partikel bzw. **(5)** zusätzlich durch einen 0,22µm Filter filtrierte Präparation von mit Wildtyp-Baculovirus infizierten Insektenzellkulturen wurden in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine entweder **(a)** unspezifisch durch Coomassie Färbung nachgewiesen, oder parallel **(b)** das Baculovirus-spezifische Hüllprotein gp64^{Bac} mittels einem anti-gp64 AK und **(c)** das Gag Protein mittels p24/55-spezifischen Antikörpern 16/4/2 und 13/5 durch Immunoblotting detektiert.

C.3.4.4 Zusammenfassung

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die mit Hilfe des rekombinanten Baculovirus-Expressionssystems aufgereinigten Pr55^{gag}-VLPs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* immunstimulatorische Eigenschaften besitzen. Auch für analog aufgereinigte Überstände von mit Wildtyp-Baculoviren infizierten Insektenzellkulturen konnten immunstimulatorische Eigenschaften *in vivo* nachgewiesen werden. Ferner wurde in den Pr55^{gag}-VLP Präparationen große Mengen des als Interferon-stimulierendes Protein (ISP; „*Interferon stimulating protein*“) bekannten, Baculo-spezifischen Hüllproteins gp64 detektiert. Daneben konnte demonstriert werden, daß die i.m. DNA-Immunisierung der pc-syngag Plasmid-DNA im Vergleich zur s.k. Immunisierung von Pr55^{gag}-VLPs zwar niedrigere Gag-spezifische AK-Titer, jedoch eine vergleichsweise identische zytotoxische T-Zellantwort im Balb/c-Mausmodell induziert. Verschiedenen „DNA-Prime/VLP-Boost“ Strategien induzierten dabei ähnlich effiziente humorale Immunantworten als eine 2-malige Immunisierung mit Virus-ähnlichen Pr55^{gag} Partikeln. Aufgrund der heterogener und zumeist unbekannten Zusammensetzung der VLPs und der infolgedessen berechtigten

Sicherheitsbedenken, stellt zusammenfassend die DNA-Immunisierung eine mögliche Alternative zur Immunisierung mit hochimmunogenen partikulären Proteinantigenen dar.

C.4 Einfluß der Antigen Lokalisation auf die Immunogenität einer DNA-Vakzine

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die Freisetzung der Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel in den extrazellulären Raum einen Einfluß auf die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine *in vivo* besitzt. Da eine kovalente Verankerung des myristylierten Pr55^{gag} Polyproteins in der Zytoplasmamembran die Voraussetzung für eine Partikelabschnürung ist, wurde zu diesem Zweck ein singulär, mutiertes gag Gen hergestellt (Gly₂→Ala₂), und die Expression nach Transfektion des entsprechenden Expressionskonstrukts (pc-syngagMyr-), welches für ein myristylierungsdefektes Pr55^{gag} Protein kodiert, analysiert. Ferner wurde ein verkürztes, für das virale, zytoplasmatische Kapsidprotein p24^{KA} kodierende Expressionskonstrukt (pc-synp24) generiert. Im Tiermodell sowie in mehreren, klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß die V3-Schleife des HI-viralen Hüllproteins gp120 (32-35aa.) wichtige immunologische Epitope beinhaltet (Javaherian *et al.*, 1990, Gorny *et al.*, 1992, LaRosa *et al.*, 1990). Aus diesen Gründen wurden neben pc-syngag, pc-syngagMyr- und pc-synp24, Expressionkonstrukte kloniert, welche um die immunogene V3-Region des HIV-1/IIIB Isolats C-terminal erweiterte Antigene exprimierten. Dadurch sollte grundsätzlich untersucht werden, ob gegen zusätzlich angefügte, immunogene Epitope oder Peptide Immunantworten *in vivo* generiert werden können.

C.4.1 Konstruktion der Expressionskonstrukte

Das myristylierungsdefekte Pr55^{gag}-Expressionskonstrukt, welches an Position 2 anstelle eines Glyzinrestes Gly₂ (GGC) einen Alaninrest Ala₂ (GCC) besitzt, wurde mittels *in vitro* Mutagenese unter Verwendung der Primerpaare GlyAla-Mut_f (5'-GGC GCC AGC ATG **GCC** GCC AGG GCC AG-3') und GlyAla-Mut_r (5'-CTG GCC CTG **GCG GCC** ATG CTG GCG GC-3') aus der Plasmid-DNA pc-syngag hergestellt (**pc-syngagMyr**-). Die kodierende Sequenz des 24kDa Kapsidproteins synp24^{KA} wurde mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares synp24_f (5'-gct cgc tcG AAT TCG CC GCC ACC **ATG** CCC ATC GTG CAG AAC ATC CAG G-3') und synp24_r (5'-gct cgc aGG ATC CTC ATC ACA GCA CCC TGG CCT TGT GGC CGG-3') aus der an das Kodon hochexprimierter Säugetiergene angepaßten, synthetischen syngag Sequenz amplifiziert. Dabei wurde zusätzlich die Kozak-Sequenz (5'-GCC GCC ACC-3') sowie das Startkodon ATG (Met_i) angefügt. Das 693bp umfassende Fragment wurde anschließend *EcoRI/BamHI* in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 umgesetzt (**pc-synp24**). Zur Herstellung der C-terminal um die V3-Region verlängerten Varianten, wurden mittels *in vitro* PCR Mutagenese unter Verwendung der Primerpaare Δ_{Stop}_f (5'-CGA CCC CAG CAG CCA GGG ATC Cgg gag cgg cg-3') und Δ_{Stop}_r (5'-cgc CGC tcc cGG ATC CCT GGC TGC TGG GGT CG-3') das Stop Kodon des syngag Fragmentes pcR-F6 deletiert und *BglII/BamHI* in pc-syngag (pc-syngagΔ_{Stop}) und pc-syngagMyr- (pc-syngagMyr-Δ_{Stop}) eingefügt. Das entsprechende Konstrukt pc-synp24Δ_{Stop} wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primerpaare synp24_f (5'-gct cgc tcG AAT TCG CC GCC ACC **ATG** CCC ATC GTG CAG AAC ATC CAG G-3') und synp24_r2 (5'-gct cgc aGG ATC CCA GCA CCC TGG CCT TGT GGC CGG-3') aus pc-syngag hergestellt. Anschließend wurde die ebenfalls durch PCR synthetisch generierte, 115bp umfassende V3-Region der env kodierenden Region des HIV-IIIB Isolates (accession number: M15654) unter Verwendung der überlappenden Primerpaare V3_f1 (5'-CAG GCC CAA CAA CAA CAC CAG GAA GAG CAT CAG

AAT CCA GAG GGG CCC CGG CAG GGC CTT CG-3') und V3_r1 (5'-GCA GTG GGC CTG CCT CAT GTT GCC GAT CTT GCC GAT GGT CAC GAA GGC CCT GCC GGG GCC C-3') sowie V3_f2 (5'-cgg cAG ATC TAA CTG CAC CAG GCC-3'), und V3_r2 (5'-gcg atG GAT CCT CAG TTG CAG TGG GCC TGC-3') und unter Einfügen eines terminalen Stop-Kodons (TGA) *Bgl*III/*Bam*HI in die mit *Bam*HI linearisierten Plasmide *pc-syngag*Δ_{Stop}, *pc-syngag*Myr-Δ_{Stop} und *pc-synp24*Δ_{Stop} kloniert, wobei die eukaryontischen Expressionskonstrukte **pc-syngagV3/IIIB**, **pc-syngagMyr-V3/IIIB** und **pc-synp24V3/IIIB** generiert wurden (vgl. Abb. C-20).

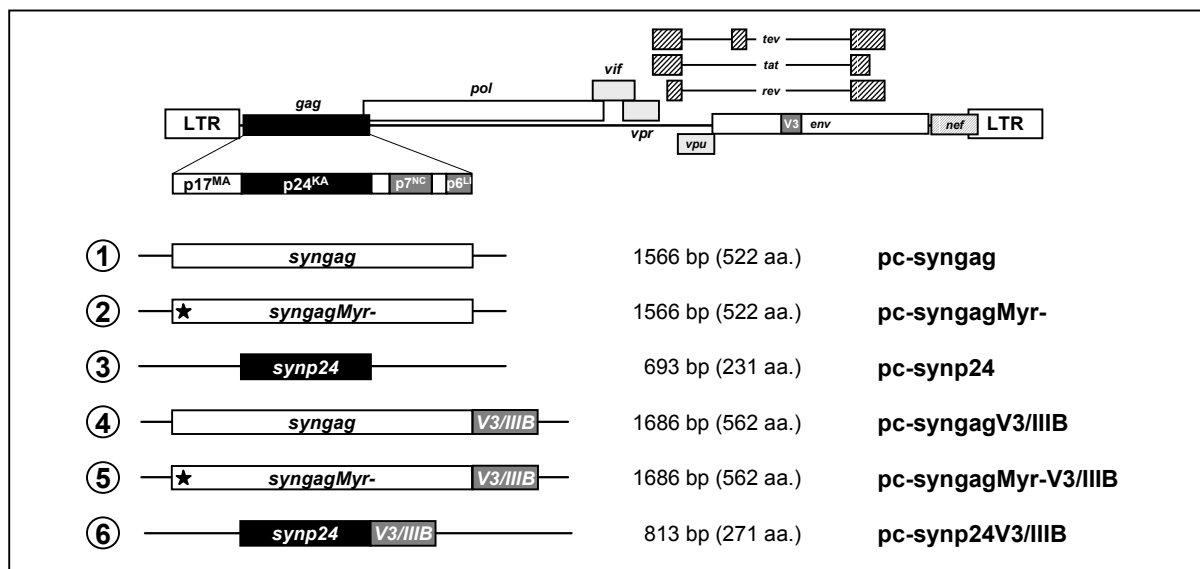


Abbildung C-20 Schematische Darstellung und Beschreibung der Gag,- bzw. p24^{KA} kodierenden Regionen der Expressionskonstrukte (1) *pc-syngag*, (2) *pc-syngag*Myr-, (3) *pc-synp24*, (4) *pc-syngag*V3/IIIB, (5) *pc-syngag*Myr-V3/IIIB und (6) *pc-synp24*V3/IIIB.

C.4.2 Analyse der Proteinexpression und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs)

Zunächst sollte die Expression und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (Pr55^{gag}-VLPs) in mit den beschriebenen Expressionsplasmiden transient transfizierten eukaryontischen Zellen analysiert werden. Dazu wurde die humane Zelllinie H1299 mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert, und nach 48h die exprimierten Gag bzw. p24 Mengen in den Zellysaten mittels Immunoblot Analyse unter Verwendung p24/p55,- und V3-spezifischer Antikörper sowie quantitativ im ELISA bestimmt. Zudem wurden die extrazellulären Gag-, bzw. p24-Konzentrationen im Überstand transfizierter Zellen im ELISA quantifiziert. Die freigesetzten VLPs wurden aus dem Überstand transfizierter Zellen durch Ultrazentrifugation durch ein 30%iges Sukrosekissen aufgereinigt und anschließend im Western Blot detektiert (vgl. Abb. C-21, B und D).

In einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions/Translations-Reaktion konnte zunächst gezeigt werden, daß die Expressionskonstrukte *pc-syngag*, *pc-syngag*Myr- und *pc-synp24* gleiche Mengen Gag bzw. p24^{KA} exprimierten (vgl. Abb. C-21, A). Nach Transfektion von *pc-syngag*Myr- konnte, im Gegensatz zu mit *pc-syngag* transfizierten Zellen keine VLPs im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Infolgedessen war die intrazelluläre Gag Konzentration in mit *pc-syngag*Myr- transfizierten Zellen, gegenüber in mit *pc-syngag* transfizierten Zellen durchschnittlich um den Faktor 9 erhöht. Obwohl keine Lipoproteinpartikel im Überstand von mit *pc-syngag*Myr- transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde dennoch extrazelluläres Pr55^{gag}

Protein, welches vermutlich aufgrund spontaner Zellyse freigesetzt wurde, im ELISA detektiert. Analoge Ergebnisse konnten auch nach Transfektion der entsprechenden, C-terminal um die V3-Schleife erweiterten Expressionsvektoren pc-syngagV3/IIIB und pc-syngagMyr-V3/IIIB und anschließender Quantifizierung der Gag Konzentrationen im ELISA erzielt werden. Nach Transfektion der verschiedenen für das 55kDa Polyprotein kodierenden Expressionsvektoren konnte im Gegensatz zu den im ELISA bestimmten intra,- und extrazellulären Mengen, im Western Blot ein Konzentrationsunterschied zwischen mit pc-syngag bzw. pc-syngagMyr- und pc-syngagV3 bzw. pc-syngagMyr-V3 transfizierten Zellen festgestellt werden. Da allerdings durch radioaktive *in vivo* Markierung exprimierter Proteine in transient transfizierten Zellen und anschließender Immunpräzipitation mit Gag-spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte, daß unabhängig von der V3-Fusion identische Pr55^{gag} Proteinmengen exprimiert werden (vgl. Abb. C-21, C), ist es wahrscheinlich, daß die Unterschiede, die im Western Blot detektiert wurden, mit der Effizienz der primären Antikörperbindung zusammenhängen.

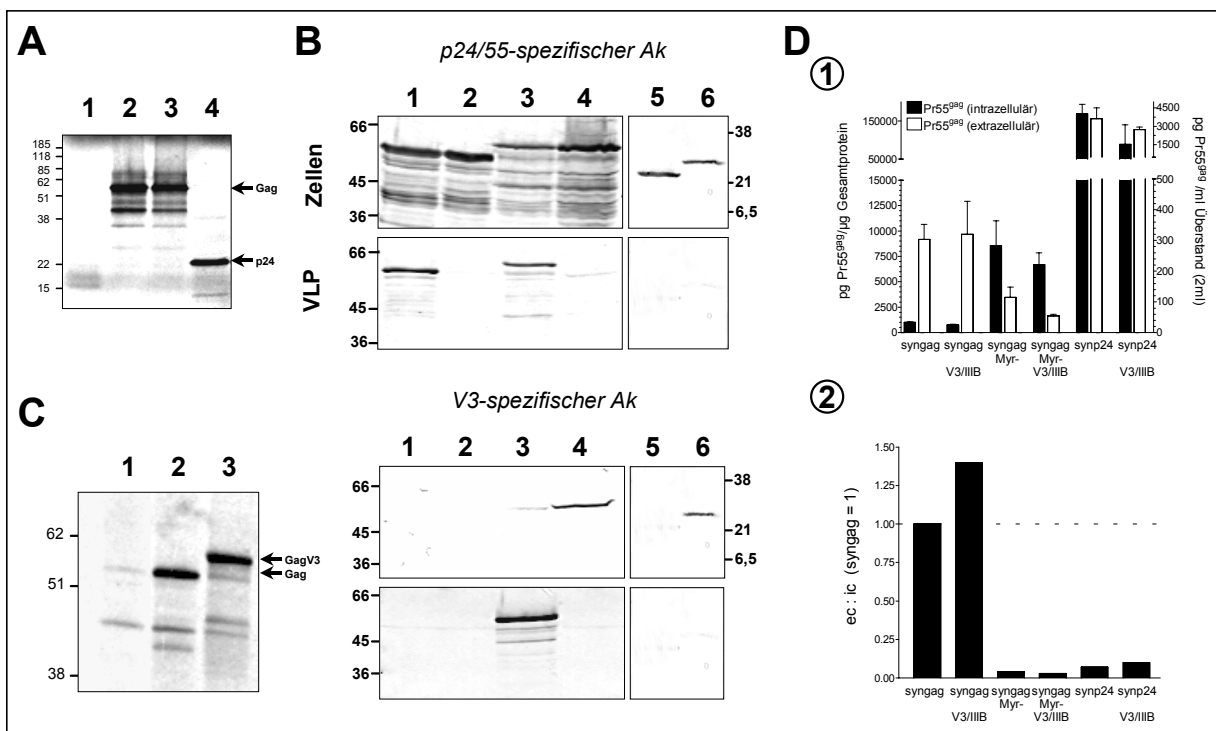


Abbildung C-21 Analyse der Gag bzw. p24^{KA} Expression sowie der Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel (Pr55^{gag}-VLPs). (A) Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation (Promega, Mannheim) von je 500ng der Expressionsvektoren (1) pcDNA3.1 (Negativkontrolle), (2) pc-syngag, (3) pc-syngagMyr- und (4) pc-synp24. (B) 48h nach Transfektion der humanen Zelllinie H1299 mit (1) pc-syngag, (2) pc-syngagMyr-, (3) pc-syngagV3/IIIB, (4) pc-syngagMyr-V3/IIIB, (5) pc-synp24 und (6) pc-synp24V3/IIIB wurden die Zellen lysiert und je 100μg Gesamtprotein sowie die aus dem Zellkulturüberstand (10ml) aufgereinigten VLPs in einem 12,5%-igem (1-4) bzw. 15%-igem (4,5) SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot mit dem p24/55-spezifischen Antikörpern 16/4/2 (obere Grafiken) bzw. dem V3-spezifischen Antikörper NEA-9305 (untere Grafiken) detektiert. (C) Mit (1) pcDNA-3 (Negativkontrolle), (2) pc-syngagMyr- und (3) pc-syngagMyr-V3/IIIB transfizierte H1299 wurden 30min mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert, die Proteine nach Zellyse mit p24/55-spezifischen Antikörpern (16/4/2 und 13/5) immunpräzipitiert, in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. (D) 36h nach Transfektion von H1299 mit den entsprechend angegebenen Expressionsvektoren wurden die intrazellulären (Zellysate) und extrazellulären (Überstände) Gag bzw. p24^{KA} Konzentrationen im (1) ELISA (pg/μg Gesamtprotein) bestimmt. (2) Darstellung der Verhältnisse von extrazellulärem (ec=extracellular) und intrazellulärem (ic=intracellular) Gag bzw. p24^{KA} (pg/μg Gesamtprotein) in Relation zu mit pc-syngag transfizierten Zellen (syngag=1).

Nach Transfektion der Expressionsvektoren pc-synp24 und pc-synp24V3/IIIB wurden intrazellulär große Mengen des Kapsidproteins nachgewiesen. Wie auch nach Transfektion von pc-syngagMyr- bzw. pc-syngagMyr-V3/IIIB, konnten auch in mit pc-synp24 bzw. pc-synp24V3/IIIB

transfizierten Zellen, im Überstand keine VLPs, sondern lediglich spontan aus lysierten Zellen freigesetztes Kapsidprotein detektiert werden. An dieser Stelle sei erwähnt, daß alle verwendeten Gag-spezifischen Antikörper gegen p24-spezifische Epitope gerichtet sind und aufgrunddessen das isolierte 24kDa Kapsidantigen um ein Vielfaches effizienter detektieren, als das 55kDa Polyprotein.

C.4.3 Vergleichende immunologische Studien *in vivo*

Zur weiteren Analyse und Evaluierung immunogener Eigenschaften der beschriebenen Pr55^{gag} und p24^{KA} Expressionsvektoren *in vivo*, wurden weibliche Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen i.m. (*tibialis anterior*) mit je 100µg der jeweiligen Plasmid-DNA immunisiert, und die Gag-spezifischen AK-Titer zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Zudem wurden eine Woche nach der dritten Immunisierung die IFN-γ Freisetzung von *in vitro* restimulierten Splenozyten untersucht und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellreaktivitäten gegen das murine Gag-spezifische ZTL-Epitop A9I^{p24} (AMQMLKETI) und das murine V3-spezifische ZTL-Epitop R10I^{V3/IIIIB} (RGPGRAFVTI) analysiert.

C.4.3.1 Einfluß der V3-Schleife auf die Immunogenität *in vivo*

In der folgenden Studie sollte zunächst analysiert werden, ob eine C-terminale Fusion von Proteinfragmenten einen Einfluß auf die Gag-spezifische humorale bzw. zelluläre Immunantwort besitzt. Ferner sollte untersucht werden, ob gegen ausgewählte Epitope der V3-Schleife ein Immunantwort *in vivo* induziert werden kann.

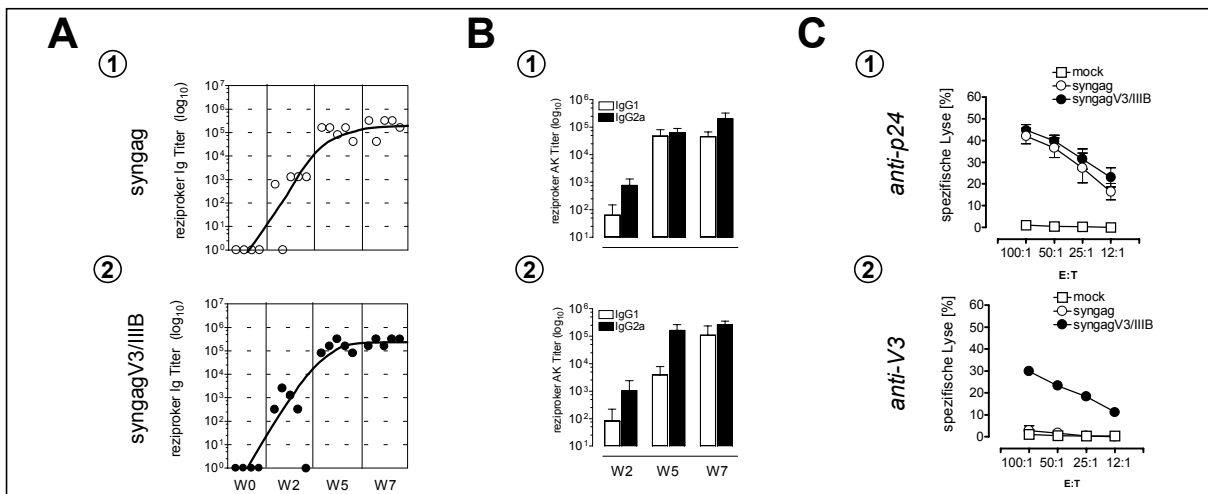


Abbildung C-22 Einfluß der C-terminalen V3-Schleife auf die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine *in vivo*. Balb/c-Mäuse wurden mit 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg pc-syngag und pc-syngagV3/IIIIB i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert. (A) Absolute Gag-spezifische Ig-Titer von mit pc-syngag (O) und pc-syngagV3/IIIIB (●) immunisierten Mäusen vor (W0) sowie 7 Tage nach der primären (W2), 2 Wochen nach der zweiten (W5) und eine Woche nach der dritten Immunisierung (W7). (B) Absolute Gag-spezifische IgG1- und IgG2a-Titer 7 Tage nach der primären (W2), 2 Wochen nach der zweiten (W5) und eine Woche nach der dritten Immunisierung (W7) mit (I) pc-syngag und (II) pc-syngagV3/IIIIB. (C) Eine Woche nach der dritten i.m. Immunisierung der Versuchstiere mit pc-syngag (O) und pc-syngagV3/IIIIB (●) wurden die Splenozyten präpariert und die CD8⁺ zytotoxische T-Zellreaktivitäten gegen mit dem MHC-Klasse I restringiertem (I) p24-spezifischem Peptid A9I^{p24} und (II) V3-spezifischem Peptid R10I^{V3/IIIIB} „gepulsten“ P815 Zielzellen im „⁵¹Cr-Release Assay“ bestimmt (mock = nicht immunisierte Balb/c-Mäuse desselben Alters)

Dabei konnte gezeigt werden, daß nach i.m. Immunisierung von pc-syngag und pc-syngagV3/IIIB zu jedem Zeitpunkt identische Gag-spezifische Ig-Titer detektiert werden konnten, wobei nach 3-maliger Immunisierung durchschnittlich Titer von 1:250.000 induziert wurden. Zudem wurden unabhängig von der Präsenz der V3-Schleife eine T_H1 -polarisierte Immunantwort induziert. In beiden Fällen konnten Gag-spezifische $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen mit nahezu gleicher Effizienz induziert werden (42-45%). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß in mit pc-syngagV3/IIIB immunisierten Versuchstieren eine spezifische gegen das V3-Epitop R101^{V3/IIIB} gerichtete, zytotoxische T-Zellantwort (30%) induziert wurde.

C.4.3.2 Einfluß der Partikelfreisetzung auf die Immunogenität *in vivo*

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Eigenschaft partikuläre Lipoproteinpartikel auszubilden, abzuschnüren und freizusetzen *in vivo* einen Einfluß auf die humorale und zelluläre Immunantwort besitzt (vgl. Abb. C-23). Hierzu wurde die durch DNA-Immunisierung induzierte Immunantwort der Expressionsplasmide pc-syngag und pc-syngagMyr- miteinander verglichen. Desweiteren sollte die Immunogenität eines für das zytoplasmatisch lokalisierte, isolierte 24kDa Kapsidprotein kodierenden Expressionskonstrukt pc-synp24 im Vergleich mit der detailliert charakterisierten pc-syngag DNA-Vakzine, welche für das komplexe, Pr55^{gag} Polypeptid kodiert, evaluiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß die durchschnittlich höchsten Gag-spezifischen AK-Titer nach 3-maliger i.m. Immunisierung von pc-syngagMyr- (1:840.000) induziert werden konnten, während die Immunisierung mit pc-synp24 Plasmid-DNA Titer von ca. 1:520.000 und die Immunisierung mit dem Expressionsvektor pc-syngag um den Faktor 3 niedrigere Titer von ca. 1:300.000 induzierten. Dennoch konnte nach der primären DNA-Immunisierung von pc-syngagMyr- und pc-synp24 lediglich in 60% der Versuchstiere Gag-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, während zu diesem Zeitpunkt in nahezu 90% der mit pc-syngag immunisierten Mäuse spezifische Antikörper detektiert wurden.

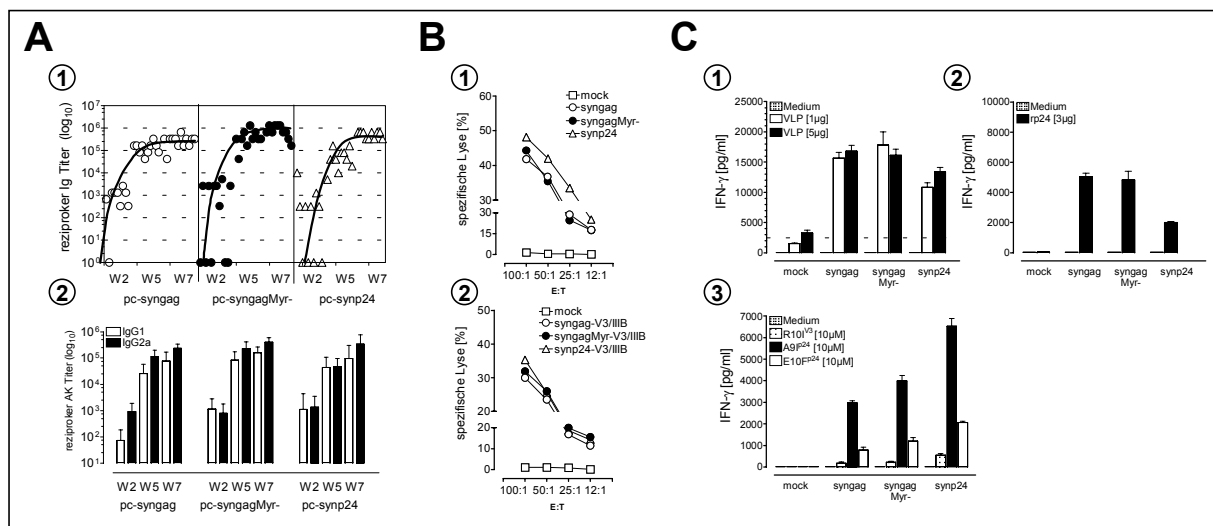


Abbildung C-23 Einfluß der Lokalisierung von *in vivo* exprimiertem Antigen auf die Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort. Balb/c-Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg der jeweiligen Plasmid-DNA i.m. (tibialis anterior) immunisiert. (A) Sieben Tage nach der primären (W2), 2 Wochen nach der zweiten (W5) sowie eine Woche nach der dritten Immunisierung (W7) mit pc-syngag (O), pc-syngagMyr- (●) und pc-synp24 (Δ) wurden (1) die absolute Gag-spezifische Ig-Titer sowie (2) die Titer der AK-Isotypen IgG1 und IgG2a bestimmt. (B) $CD8^+$ -Zytotoxische T-Zellantwort gegen (1) mit dem p24-spezifischem ZTL-Peptid A9P^{24/1} „gepulsten“ P815 Zielzellen von mit pc-syngag (O), pc-syngagMyr- (●) und synp24 (Δ) immunisierten Versuchstieren bzw. (2) mit dem V3-spezifischem ZTL-Peptid R101^{V3/IIIB} „gepulsten“ P815 Zellen von mit pc-syngagV3/IIIB (O), pc-syngagMyr-V3/IIIB (●) und pc-synp24V3/IIIB (Δ) immunisierten Mäusen eine Woche nach der dritten Immunisierung (C) Freisetzung von IFN-γ nach *in vitro* Stimulation der Splenozyten mit (1) 1µg bzw. 5µg Pr55^{gag}-VLPs, (2) mit 3µg rekombinantem Kapsidantigen und (3) mit je 10µM MHC-I restringierten Peptiden A9P^{24/1}, E10P^{24/2} und R101^{V3/IIIB}. (mock = mit pCI-HbsAg immunisierte Balb/c-Mäuse)

Unabhängig von der immunisierte Plasmid-DNA und dem jeweiligem Zeitpunkt der Messung, wurde eine T_H1 , bzw. eine gemischte T_H1/T_H2 -polarisierte Immunantwort nachgewiesen. Ferner wurde die effizienteste ZTL-spezifische Lyse (E:T Ratio von 100:1) von das p24-Epitop A9I^{p24/1} präsentierenden autologen Zielzellen in den mit pc-synp24 immunisierten Versuchstieren detektiert (50%). In mit pc-syngagMyr- immunisierten Tieren (44%) wurden durchschnittlich geringfügig höhere $CD8^+$ zytotoxische T-Zellreaktivitäten nachgewiesen als in mit pc-syngag immunisierte Mäusen (42%). Analog waren auch die ZTL-spezifischen Reaktivitäten gegen das V3-Epitop R10I^{V3/IIIB} nach i.m. Immunisierung des Vektors pc-synp24V3/IIIB, im Vergleich zu pc-syngagV3/IIIBMyr (32%) und pc-syngagV3/IIIB (30%), am höchsten (35%). Die ermittelte $CD8^+$ zytotoxische T-Zellaktivität der immunisierten Tiere korrelierte dabei mit der IFN- γ Freisetzung von mit den jeweiligen ZTL-Peptiden *in vitro* restimulierten Splenozyten. Jedoch wurde beobachtet, daß die Menge an freigesetztem IFN- γ nach *in vitro* Stimulation mit komplexen Antigenen, wie z.B. Pr55^{gag}-VLPs oder rekombinantem p24^{KA} den mit pc-synp24 immunisierten Mäuse deutlich niedriger war (Faktor 1,5-2,5), als bei denjenigen, die mit pc-syngag oder pc-syngagMyr- Plasmid-DNA immunisiert worden waren. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mit den entsprechenden, die für die V3-Schleife kodierende Region erweiterten Expressionskonstrukten pc-syngagV3/IIIB, pc-syngagMyr-V3/IIIB und pc-synp24V3/IIIB reproduziert werden (nicht gezeigt).

C.4.4 Zusammenfassung

In diesen Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, daß durch den Aminosäureaustausch (Gly₂→Ala₂) die Ausbildung, Abschnürung und Freisetzung von Pr55^{gag}-VLPs in mit pc-syngagMyr- transfizierten eukaryontischen Zellen inhibiert werden kann. Dennoch konnte, vermutlich aufgrund lytischer Prozesse, das transient exprimierte myristylierungsdefekte Pr55^{gag} Protein, wie auch das 24kDa Kapsidantigen im extrazellulären Raum nachgewiesen werden. Nach i.m. DNA-Immunisierung der beschriebenen Expressionsvektoren konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit Lipoproteinpartikel freizusetzen keinen wesentlichen Einfluß auf die zelluläre und humorale Immunogenität einer Gag-spezifischen DNA-Vakzine *in vivo* besitzt. Demgegenüber konnte vielmehr durch die Blockierung der Partikelfreisetzung (pc-syngagMyr-) sowohl die induzierten Gag-spezifischen AK-Titer als auch geringfügig die p24-spezifische $CD8^+$ ZTL-Antwort gesteigert werden. Vergleichbar hohe AK-Titer und gegenüber dem Gag Protein leicht erhöhte ZTL-Antworten konnte dagegen nach Immunisierung eines für das zytoplasmatisch lokalisierte 24kDa-Kapsidprotein kodierenden Expressionsvektors (pc-synp24) detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß durch eine C-terminale Verlängerung der Pr55^{gag}-Aminosäuresequenz, wie z.B. der V3-Schleife, weder die Expression und die Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel *in vitro*, noch die Gag-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort *in vivo* beeinflusst wurde. Zudem konnten in mit pc-syngagV3/IIIB immunisierten Versuchstieren die Induktion einer V3-spezifischen, zytotoxischen T-Zellantwort detektiert werden.

C.5 Modulation der Immunantwort: gerichteter Transport viraler Antigene in das Endoplasmatische Retikulum

In der folgenden Studie sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine veränderte, post-translationale Translokation der HI-viralen Antigene Pr55^{gag} und p24^{KA} in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die infolgedessen ermöglichte Sekretion der Antigene auf die Immunogenität der DNA-Vakzine Kandidaten *in vivo* besitzt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Vektoren generiert, dessen Genprodukte eine N-terminale ER-Signalsequenz enthalten, welche eine ko-translationale Translokation des Pr55^{gag}, des myrestilierungsdefekten Pr55^{gag} und des Kapsidproteins p24^{KA} ermöglichen sollte. Zudem wurde durch eine singuläre, konservative Aminosäuresubstitution (Met₁₄₂→ Cys₁₄₂) eine erst kürzlich beschriebene interne Translationsinitiationsstelle, nahe dem N-Terminus des Kapsidantigens (Buck *et al.*, 2001) zerstört, um auf diese Weise die Bedeutung der internen Translationsinitiationsstelle bzw. der dadurch generierten 40kDa-Gag Isoform (p40*) für die Induktion Gag-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten *in vivo* zu untersuchen. In den nachfolgenden Experimenten sollte die Expression der auf diese Weise veränderten Expressionsvektoren molekularbiologisch charakterisiert und der Einfluß der veränderten Lokalisation viraler Antigene auf die Immunogenität der DNA-Vakzine Kandidaten im Balb/c-Mausmodell untersucht werden.

C.5.1 Konstruktion der Expressionskonstrukte

Zur Herstellung der die N-terminalen ER-Signalsequenz tragenden Pr55^{gag} bzw. p24^{KA} Expressionsvektoren wurde jeweils nur der 5'-Teilbereich des gesamten Gens durch PCR unter Verwendung des allgemeinen Primers ER_r (5'-gct gCC GCG GGG CTC CCT CAT CTG GC-3') und dem jeweiligen spezifischen Primer ER1syngag_f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CAT GGG CGC CAG GGC CAG CGT GCT G-3'), ER1Myr_f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CAT GGC CGC CAG GGC CAG CGT GCT G-3') oder ER1synp24_f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CAT GCC CAT CGT GCA GAA CAT CCAG -3') amplifiziert und durch aufeinander folgende PCR-Zyklen mit den allgemeinen Primern ER_r, ER2_f (5'-GGT ACA TGA TTT TAG GCT TGC TCG CCC TTG CCG CAG TCT GCA GCG CTG C-3') und ER3_f (5'-cgc tcA AGC TTG CCG CCA CCA TGA GGT ACA TGA TTT TAG GCT TGC TCG-3') schrittweise am N-Terminus um eine für die ER-Signalsequenz kodierende Sequenz (54bp), einer Kozak-Sequenz (5'-GCCGCCACC-3') und einer *HindIII*-Restriktionschnittstelle verlängert. Diese 18 Aminosäuren umfassende ER-Signalsequenz (MRYMILGLLALAAVCSAA/xxx) stammt ursprünglich von dem adenoviralem (Ad2) Glykoprotein 19kDa-E3. Die verlängerten Genfragmente ERsyngag, ERsyngagMyr- und ERsynp24 wurden anschließend *HindIII*/*SacII* in die ursprünglichen, die kodierende Gensequenz enthaltenen Expressionsvektoren umgesetzt. Die beschriebenen Konstrukte besitzen nach Abspaltung des Signalpeptids nach dem Alaninrest Ala₁₇ die Aminosäuresequenz Ala₁Met₂. Varianten dieser Expressionskonstrukte, denen das Methionin Met₂ fehlt, und an der entsprechenden Position die natürlich nachfolgende Aminosäure besitzen (Ala₁Gly₂ (syngag); Ala₁Ala₂ (syngagMyr-) oder Ala₁Pro₂ (synp24) wurden nach obigem Protokoll unter Verwendung der Primer ER1syngagΔ_{AUG1}-f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CCG CGC CAG GGC CAG CGT GCT G-3'), ER-Myr-Δ_{AUG1}-f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CCG CGC CAG GGC CAG CGT GCT G-3'), sowie ERsynp24Δ_{AUG1}-f (5'-CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC CCC CAT CGT GCA GAA CAT CCAG -3') generiert. Zur Zerstörung der

internen Translationsinitiationsstelle Met₁₄₂ innerhalb des myristylierungsdefekten Pr55^{gag} Proteins und des p24 Kapsidantigens, wurde das kodierende Triplet ATG zu TGC (Cys₁₄₂) durch *in vitro* PCR Mutagenese unter Verwendung des Primerpaares ATG₁₄₂i.v.M._f (5'-GAA CAT CCA GGG CCA GTG CGT GCA CCA GGC CAT C-3') und ATG₁₄₂ i.v.M._r (5'-GAT GGC CTG GTG CAC GCA CTG GCC CTG GAT GTT C-3') mutiert. Als Matrize wurden diejenigen Konstrukte verwendet, denen bereits das Methionin an Position 2 der gag bzw. p24 kodierenden Region fehlt. Eine schematische Darstellung und Beschreibung der generierten Expressionskonstrukte ist in nachfolgender Abbildung (C-24) gezeigt.

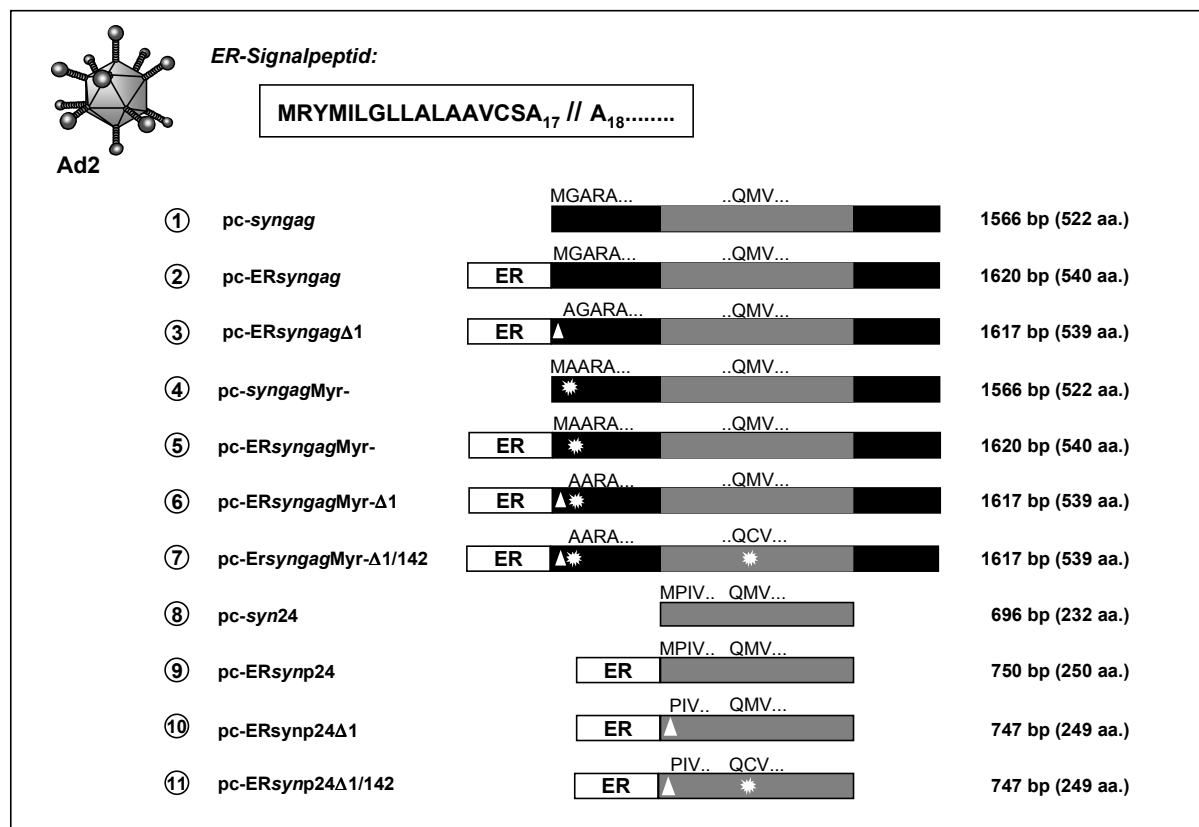


Abbildung C-24 Schematische Darstellung und Beschreibung der verschiedenen Expressionsvektoren (1-11), welche für das HI-virale Pr55^{gag} (1), das myristylierungsdefekte Pr55^{gag} (4) und das 24kDa Kapsidantigen (8) kodieren, sowie Varianten derselben, die N-terminal mit einer ER-Signalsequenz des adenoviralen (Ad2) 19kDa E3 Proteins fusioniert sind (2,3,5-7, 9-11) und wobei zusätzlich die interne Translationsinitiationsstelle (Met₁₄₂→Cys₁₄₂) zerstört wurde (7,11). Das Signalpeptid wird durch eine ER-ständige Signal-Peptidase zwischen den beiden Alaninresten Ala₁₇ und Ala₁₈ abgespalten, so daß jedes dieser exprimierte HI-virale Protein mit einem Alaninrest Ala₁ beginnt.

C.5.2 Expressionanalyse und subzelluläre Lokalisierung viraler Antigene in eukaryontischen Zellen

C.5.2.1 Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation®

Die Genexpression der verschiedenen Vektoren sollte zunächst *in vitro* unter Verwendung einer gekoppelten Transkription/Translationsreaktion untersucht werden (vgl. Abb. C-25). Zudem sollten dabei das Molekulargewicht der Genprodukte überprüft werden. Dabei wurde zunächst beobachtet, daß alle ER-Fusionsproteine ein höheres Molekulargewicht besaßen und daß zudem die Effizienz der Transkription und/oder Translation und infolgedessen die Genexpression der

Fusionsproteine gegenüber Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr- bzw. p24^{KA}, *in vitro* gesteigert war. Ferner konnte für die p24^{KA}-Expressionsvektoren gezeigt werden, daß Deletionen (pc-synp24Δ1) bzw. Mutationen (pc-synp24Δ1/142) von ATG-Kodons in der 5'-kodierenden Region, die Generierung zusätzlichen Translationsinitiationsprodukte (p24*) mit einem geringeren Molekulargewicht (< 24kDa) *in vitro* verhindern können.

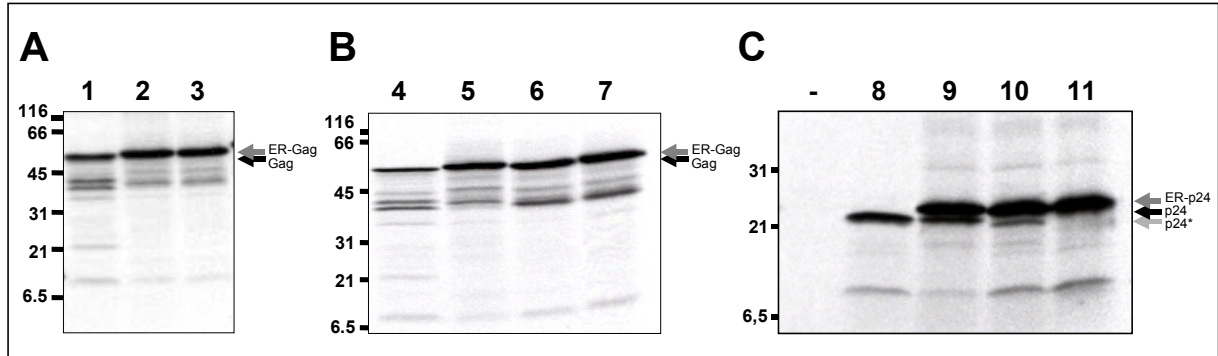


Abbildung C-25 Analyse der Genexpression durch gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation (Promega, Mannheim). (A) Expression von Pr55^{gag} ((1) pc-syngag) und ER-Pr55^{gag} ((2) pc-ERSyngag, (3) pc-ERSyngagΔ1) (B) Expression myristylierungsdefekte Gag Varianten: Pr55^{gag}Myr- ((4) pc-syngagMyr-) und ER-Pr55^{gag} ((5) pc-ERSyngagMyr-, (6) pc-ERSyngagMyr-Δ1 und (7) pc-ERSyngagMyr-Δ1/142) (C) Expression von p24^{KA} ((8) pc-synp24) und ER-p24^{KA} ((9) pc-ERSynp24, (10) pc-ERSynp24Δ1 (11) ERSynp24Δ1/142). In die Reaktionen wurden je 500ng der entsprechenden Plasmid-DNA eingesetzt und je 1/10 des 25μl Ansatzes über ein 12,5%-iges (A, B) bzw. 15%-iges (C) SDS-PAGE aufgetrennt und die Genprodukte autoradiographisch detektiert. (Schwarze Pfeile markieren die ursprüngliche Größe der jeweiligen Proteine, die grauen Pfeile markieren die Laufhöhe der ER-Fusionsproteine; p24* = Genprodukte aufgrund alternativer AUG Translationsinitiation)

C.5.2.2 ER-Lokalisation modifizierter HI-viraler Antigene

Zur Identifizierung der Lokalisation der HI-viralen Antigene Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr und p24^{KA} sowie der jeweiligen ER-Fusionsproteine wurde die humane Zelllinie H1299 mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert und nach 24h die Verteilung und Lokalisation der exprimierten Isoformen mit Hilfe p24-spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (vgl. Abb. C-26). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das ER-ständige, in der Membran verankerten Markerprotein Calnexin sollte dabei eine (Ko)-Lokalisation der ER-Fusionsproteine im ER nachgewiesen werden. Nach Transfektion von pc-syngag, pc-syngagMyr- und pc-synp24 konnte eine gleichmäßige, zelluläre Verteilung der viralen Proteine beobachtet werden. Ferner konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, daß durch das Anfügen einer N-terminalen ER-Signalsequenz die exprimierten Proteine in definierbaren Kompartimenten in unmittelbarer Nähe des Zellkerns sowie polar zum Zellkern lokalisiert sind, die mit Hilfe des Calnexin-spezifischen Antikörpers als Endoplasmatisches Retikulum identifiziert werden konnten. Dabei konnte zudem beobachtet werden, daß nach Transfektion aller, für das 55kDa Gag Polyprotein kodierenden Expressionsvektoren, wie z.B. pc-ER-syngagΔ1, ER-syngagMyr-Δ1 und ER-syngagMyr-Δ1/142, die Antigene zwar vorwiegend aber nicht ausschließlich im ER lokalisiert waren. Dagegen konnten alle 24kDa Kapsidproteine nach Transfektion von z.B. pc-ERSynp24, pc-ERSynp24Δ1 und pc-ERSynp24Δ1/142 ausschließlich im ER nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, daß durch eine N-terminale Fusion der ER-Signalsequenz, ursprünglich zytoplasmatische Proteine in das ER transloziert werden.

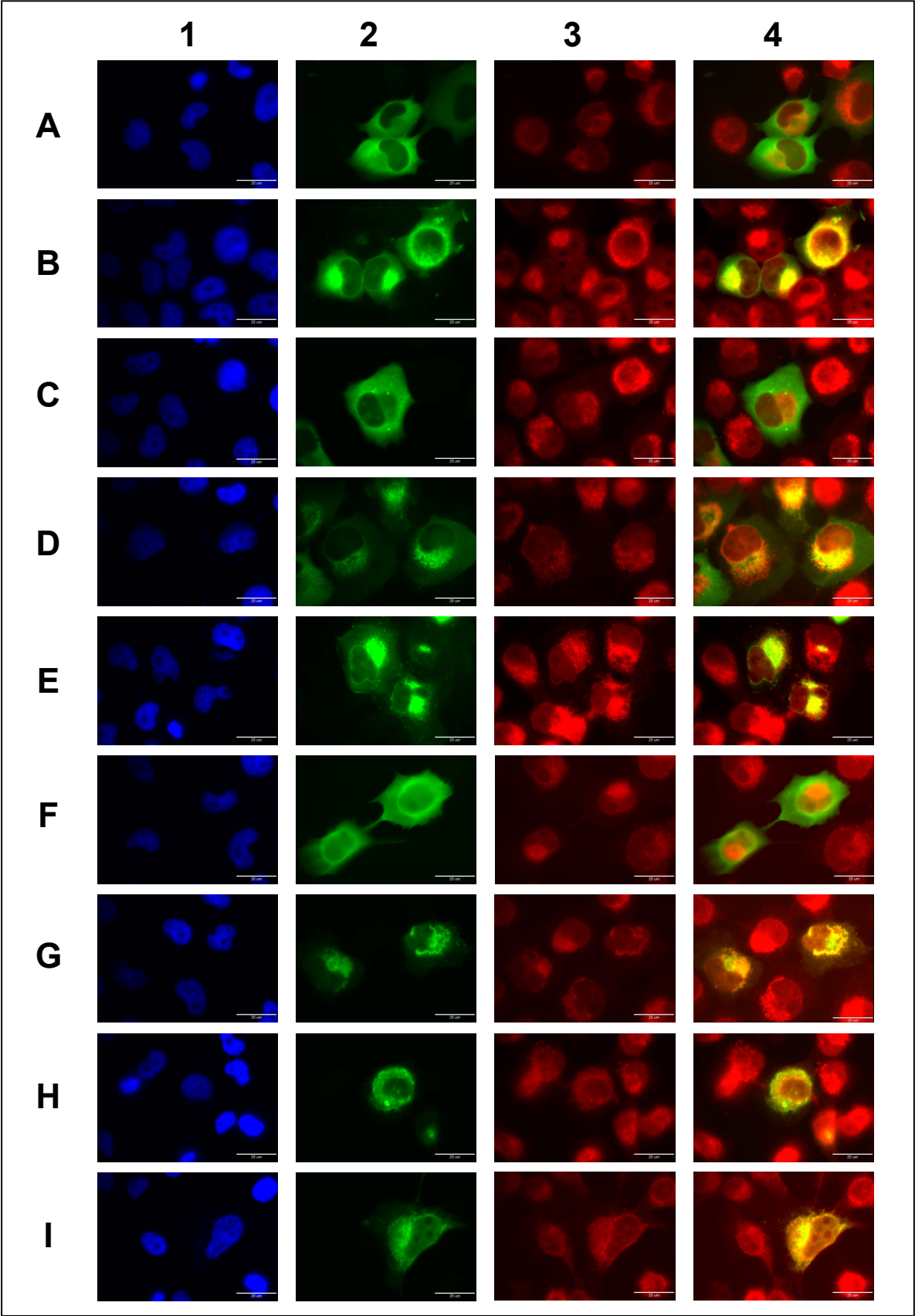


Abbildung C-26 Immunfluoreszenzmikroskopie. Nach Transfektion von H1299 Zellen mit den entsprechenden Vektoren (A-I) wurden die viralen Proteine (1) in den mit DAPI unspezifisch angefärbten Zellen (2) mit Hilfe p24/55-spezifischer Antikörper (16/4/2 und 13/5) und anti-mouse-FITC sekundären AK sowie (3) das ER-Markerprotein Calnexin mit dem Antikörper H-70 und anti-rabbit-Cy3 konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. (4) Ko-Lokalisation (gelber Bereich) durch Überlagerung grün-fluoreszierender (Gag bzw. p24) und rot-fluoreszierender Bereiche (Calnexin). (Expressionsvektoren: (A) pc-syngag (B) pc-ERSyngagΔ1 (C) pc-syngagMyr- (D) pc-ERSyngagMyr-Δ1 (E) pc-syngagMyr-Δ1/142 (F) pc-syngp24 (G) pc-ERSyngp24 (H) pc-ERSyngp24Δ1 (I) pc-ERSyngp24Δ1/142)

C.5.2.3 Sekretion modifizierter HI-viraler Antigene

In den folgenden Versuchen sollte die Sekretion der aufgrund der N-terminalen Signalsequenz in das ER translozierten, viralen Proteine, Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr- und p24^{KA} nachgewiesen werden. Dazu wurden humane H1299 Zellen mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert, 24h nach Transfektion in An- und Abwesenheit von Brefeldin A (BFA) mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin *in vivo* markiert und die transient exprimierten, HI-viralen Proteine sowohl aus den Zellysaten als auch aus den Zellkulturüberständen mittels p24/p55-spezifischer Antikörper immunpräzipitiert (vgl. Abb. C-27). Das aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* gewonnene Stoffwechselprodukt Brefeldin A inhibiert den vesikulären Transport vom ER in Richtung Golgi und inhibiert infolgedessen die Proteinsekretion in eukaryontischen Zellen.

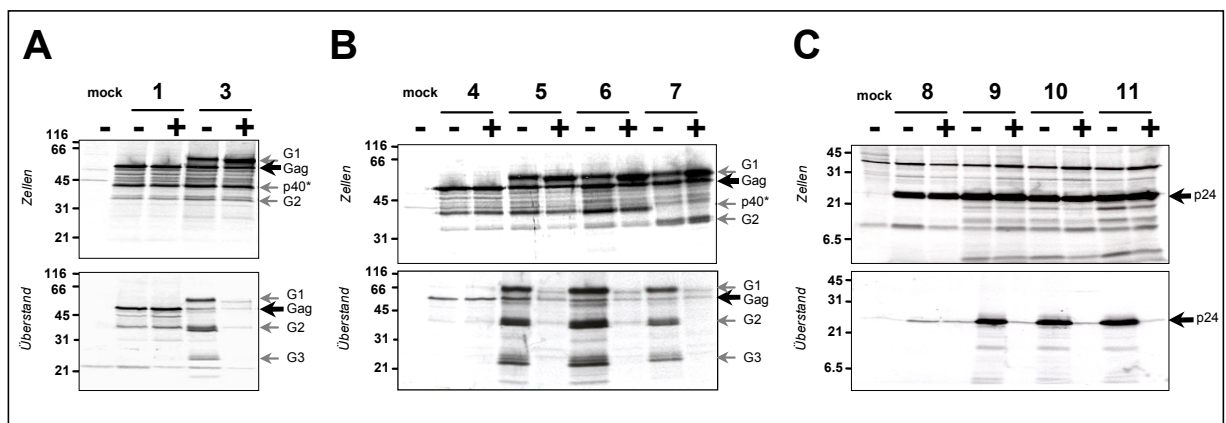


Abbildung C-27. Sekretion der in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportierten viralen Antigene (A) Pr55^{gag}, (B) myristylierungsdefektes Pr55^{gag}Myr- und (C) p24 Kapsidantigen. 24h nach Transfektion humaner H1299 Zellen mit (mock) pcDNA3, (1) pc-syngag, (3) pc-ERSyngagΔ1, (4) pc-syngagMyr-, (5) pc-ERSyngagMyr (6) pc-ERSyngagMyrΔ1, (7) pc-ERSyngagMyrΔ1/142, (8) pc-syngp24, (9) pc-ERSyngp24, (10) pc-ERSyngp24Δ1 und (11) pc-ERSyngp24Δ1/142 wurden die transient exprimierten Proteine *in vivo* radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin markiert (4h) und anschließend die HIV-spezifischen Proteine mittels p24/p55-spezifischen Antikörpern (16/4/2 und 13/5) aus den Zellysaten sowie Zellkulturüberständen immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde daraufhin elektrophoretisch in einem 12,5%- (A,B) bzw. 15%-igem SDS-PAGE (C) aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Zur Blockierung der zellulären, sekretorischen Prozesse wurde in Parallelansätzen die radioaktive Markierung in Gegenwart (+) von Brefeldin A (5μg/ml) durchgeführt.

Das 55kDa Gag Protein konnte sowohl in den Zellen als auch in den Überstand von mit pc-syngag transfizierten Zellen detektiert werden. Da die Menge an extrazellulärem Protein durch die Anwesenheit von BFA nicht verändert wurde, konnte demonstriert bzw. bestätigt werden, daß die Freisetzung des myristylierten Polyproteins in Form Virus-ähnlicher Partikel ein von der Proteinsekretion unabhängiger Prozeß ist. Im Gegensatz dazu konnten nach Transfektion von pc-ERSyngagΔ1 zwei dominante, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorhandene Gag-spezifische Isoformen (55kda, > 55kDa) detektiert werden. Beide Isoformen konnten als Sekretproteine identifiziert werden, da durch BFA die Sekretion in den Überstand inhibiert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transfektion der für das myristylierungsdefekte Gag

Protein kodierenden Vektoren pc-syngagMyr- und pc-syngagMyr-Δ1 erzielt. Nach Transfektion von pc-syngagMyr wurde das 55kDa Protein sowohl in den Zellysaten als auch unabhängig von der Anwesenheit von BFA im Überstand detektiert. Da allerdings im Vergleich zu mit pc-syngag transfizierten Zellen die Menge an extrazellulärem Protein signifikant reduziert war und die Ausbildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel nachweislich nicht möglich ist, handelt es sich in diesem Fall vermutlich spontan durch Zellyse freigesetztes Protein. Zudem konnte gezeigt werden, daß auch nach Transfektion von pc-ERsyngagMyr-, pc-ERsyngagMyr-Δ1 und pc-ERsyngagMyr-Δ1/142 zwei sekretorische Gag-spezifische Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht in den Zellysaten und im Überstand vorhanden waren. Zusätzlich aber wurde nach Transfektion von pc-ERsyngagMyr-Δ1/142 der Wegfall einer ca. 40kDa Gag-spezifischen, lediglich intrazellulär lokalisierten Isoform beobachtet. Ferner konnte gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu denjenigen Zellen, die mit den für das 55kDa Polyprotein kodierenden Vektoren transfiziert worden waren, nach Transfektion von pc-ERSynp24, pc-ERSynp24-Δ1 und pc-synp24-Δ1/142 lediglich ein sekretorisches, 24kDa Protein *in vivo* exprimiert wurde, welches sowohl intrazellulär als auch in Abwesenheit von BFA im Überstand nachgewiesen werden konnte. Im allgemeinen konnte festgestellt werden, daß alle mit dem Signalpeptid versehenen Fusionsproteine stärker exprimiert werden. Ferner konnten bei allen in den Überstand sezernierten 55kDa Gag-spezifischen Proteine insgesamt vier dominante Isoformen detektiert werden: wt-Gag (55kDa), G1 (< 55kDa), G2 (~35kDa) und G4 (~25kDa). Zudem wurde beobachtet, daß eine Inhibition der Proteinsekretion nach Transfektion der für die in das ER translozierten 55kDa Polyproteine kodierenden Expressionsvektoren eine intrazelluläre Akkumulation der G1-Isoform in Relation zu dem 55kDa Gag Protein führte.

C.5.3 Einfluß einer veränderten, zellulären Lokalisation und Sekretion HI-viraler Antigene auf die Immunogenität *in vivo*

Im folgenden sollten die Auswirkungen einer ko-translationalen, in das ER translozierten und von den Zellen in großen Mengen sezernierten viralen Antigenen (sc) im Vergleich zu zytoplasmatisch lokalisierten (zy) oder als integrierter Bestandteil von Lipoproteinpartikeln (pa) in den Überstand freigesetzten HI-viralen Proteine auf die Immunogenität *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden weibliche Balb/c Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 50µg der jeweiligen, an entsprechender Stelle angegebenen Plasmid-DNA i.m. (*Tibialis anterior*) immunisiert und die humorale und zelluläre Immunantwort zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Gag-spezifischen Ig-, IgG1,- und IgG2a-Titer der immunisierten Versuchstiere zwei Wochen nach der zweiten bzw. eine Woche nach der dritten Immunisierung bestimmt. Zudem wurden die Antigen-spezifischen, zellulären Reaktivitäten der Milzzellen eine Woche nach der dritten Immunisierung untersucht.

C.5.3.1 Zytoplasmatische versus sekretorische Antigene

In der folgenden Studie sollte die Immunogenität des myristylierungsdefekten und infolgedessen zytoplasmatisch, lokalisierten 55kDa Polyproteins (zy-Pr55^{gag}) sowie des 24kDa Kapsidantigens (zy-p24^{KA}) mit den entsprechenden modifizierten und sezernierten Proteinvarianten (sc-Pr55^{gag}; sc-p24^{KA}) verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere mit den Expressionsvektoren pc-syngagMyr- (zy-Pr55^{gag}), pc-ERsyngagMyr-Δ1 (sc-Pr55^{gag}), pc-synp24 (ic-p24^{KA}) und pc-synp24Δ1 (sc-p24^{KA}) immunisiert und die Immunantworten

vergleichend analysiert (vgl. Abb. C-28, A und B). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Expression des sekretorischen Gag Proteins *in vivo* im Vergleich zu der intrazellulär lokalisierten Variante, eine eindeutige T_H2 -polarisierte Immunantwort ($IgG1 > IgG2a$) induziert, die charakterisiert ist, durch eine Erhöhung Gag-spezifischer Antikörper (Faktor 2) sowie einer um den Faktor 2 reduzierten Freisetzung von $IFN-\gamma$ nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit spezifischen Peptiden. Dennoch konnten keine Unterschiede hinsichtlich der *in vivo* induzierten und gegen das murine p24-spezifische Epitop A9IP^{24/1} gerichtete $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellantwort beobachtet werden (21% spezifische Lyse bei einer E:T Ratio von 50:1). Im Gegensatz dazu konnte nach Immunisierung des für das sekretorische Kapsidantigen kodierenden Expressionskonstrukts pc-synp24 Δ 1 eine signifikante Reduktion (Faktor 3) sowohl der induzierten p24-spezifischen ZTL-Antwort als auch der $IFN-\gamma$ Freisetzung nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit Peptiden nachgewiesen werden. Während somit nach Immunisierung der pc-synp24 Plasmid-DNA eine Peptid-spezifische Lyse von durchschnittlich 27% gemessen wurde, konnte nach Immunisierung von pc-ERSynp24 Δ 1 lediglich eine Lyse von 8,5% detektiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, daß auch eine Expression des sekretorischen 24kDa Kapsidantigens *in vivo* eine deutliche T_H2 -polarisierte Immunantwort sowie eine leichte Erhöhung Gag-spezifischer Ig-Titer (Faktor 1,5) induzierte.

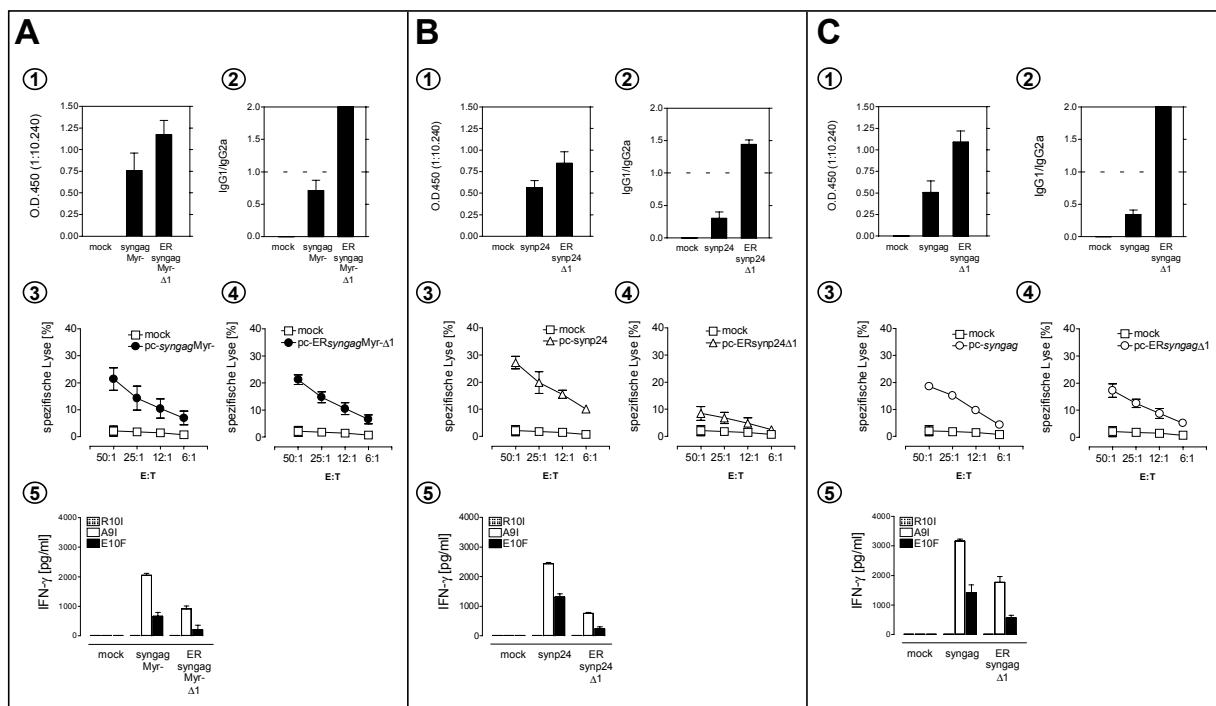


Abbildung C-28 Einfluß der Lokalisation viraler Antigene auf die Immunogenität *in vivo*. Balb/c-Mäuse wurden 3x mit je 50µg Plasmid-DNA i.m. (Tibialis anterior) immunisiert und die induzierten (1) Gag-spezifischen AK-Titer sowie (2) das Verhältnis der AK-Isotypen (IgG1/IgG2a) 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung und eine Woche nach der dritten Immunisierung analysiert. Aus den präparierten Milzzellkulturen (3+4) wurde die ZTL-spezifische Lyse von mit A9P²⁴ „gepulsten“ P815 Zielzellen sowie (5) die $IFN-\gamma$ Freisetzung mit Peptid *in vitro* restimulierter Splenozyten bestimmt. (A) Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort von zytoplasmatischem (zy-Pr55^{gag}) und sekretorischem (sc-Pr55^{gag}) 55kDa Gag Protein nach Immunisierung von pc-syngagMyr- und pc-ERSyngagMyr- Δ 1 (B) Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort von zytoplasmatischem (zy-p24^{KA}) und sekretorischem (sc-p24^{KA}) 24kDa Kapsidantigen nach Immunisierung von pc-synp24 und pc-ERSynp24 Δ 1. (C) Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort von partikulärem (pa-Pr55^{gag}) und sekretorischem (sc-Pr55^{gag}) 55kDa Gag Protein nach Immunisierung von pc-syngag und pc-ERSyngag Δ 1.

C.5.3.2 Partikuläres versus sekretorisches Antigen

Im folgenden Versuch sollte die Immunogenität des in Form von Virus-ähnlichen Partikeln aus den Zellen freigesetzte, myrisylierte partikuläre 55kDa Polyproteins (pa-Pr55^{gag}) mit dem

entsprechendem modifizierten und sezernierten Proteinvariante (sc-Pr55^{gag}) verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere mit den Expressionsvektoren pc-syngag und pc-ERSyngag Δ 1 immunisiert und die induzierte Immunantwort analysiert (vgl. Abb. C-28, C). Dabei konnte gezeigt werden, daß die *in vivo* Expression des sekretorischen Gag Proteins im Vergleich zum partikulärem Pr55^{gag} eine T_H2-polarisierte Immunantwort induziert, die geprägt ist von einer leichten Erhöhung Gag-spezifischer, humoraler Immunantworten (Faktor 1,5) und einer um den Faktor 2 reduzierten IFN- γ Sekretion nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit Peptiden. Dennoch wurde unabhängig davon, ob das 55kDa Antigen sezerniert oder als VLPs freigesetzt wurde, eine unveränderte, p24 (A9I^{p24/1})-spezifische CD8⁺ zytotoxische T Zellyse von durchschnittlich 18,5% (pc-syngag) bzw. 17,3% (pc-ERSyngag Δ 1) detektiert.

C.5.3.3 Einfluß der zytoplasmatischen p40* Gag-Isoform auf die Immunogenität antigener Sekretproteine

In der folgenden Studie sollte der Rolle der aufgrund einer internen Cap-unabhängigen Translationsinitiationsstelle generierten und zytoplasmatisch lokalisierten p40* Gag-Isoform bei der Induktion spezifischer Immunantworten gegen die sekretorischen Proteine, sc-Pr55^{gag} und sc-p24^{KA} untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere mit den Expressionsvektoren pc-ERSyngagMyr- Δ 1, pc-ERSyngag Δ 1/142, pc-ERSynp24 Δ 1 und pc-ERSynp24 Δ 1/142 i.m. immunisiert und die induzierte Immunantwort analysiert (vgl. Abb. C-29).

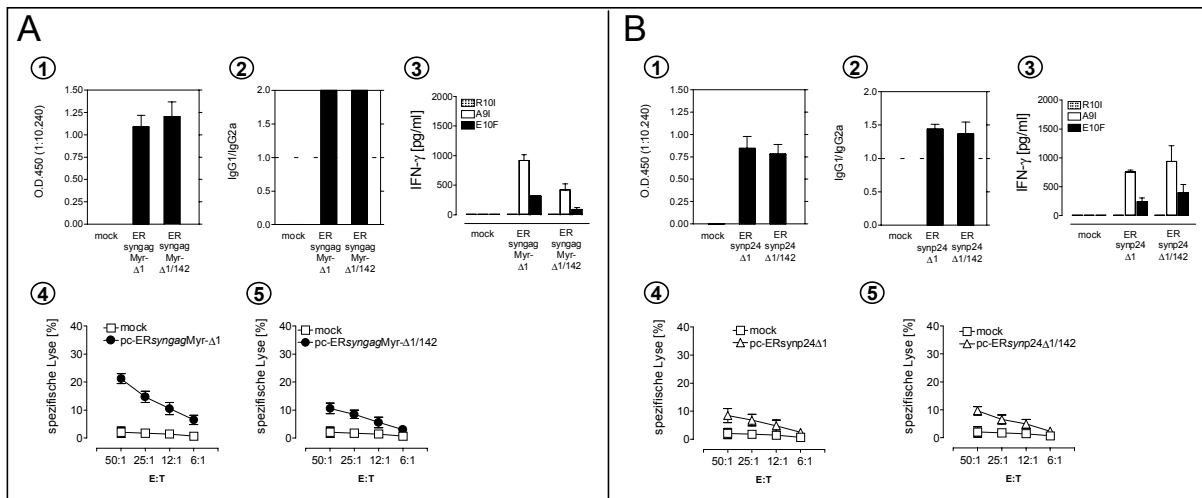


Abbildung C-29 Bedeutung des aufgrund einer internen Translationsinitiationsstelle generierten, zytoplasmatisch lokalisierten p40* Gag-Isoform für die Immunogenität sekretorischer Antigene *in vivo*. Balb/c-Mäuse wurden 3x mit je 50µg Plasmid-DNA i.m. (Tibialis anterior) immunisiert und die induzierten (1) Gag-spezifischen AK-Titer sowie (2) das Verhältnis der AK-Isotypen (IgG1/IgG2a) 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung und eine Woche nach der dritten Immunisierung analysiert. (3) IFN- γ Sekretion von mit Peptid *in vitro* restimulierten Splenozyten (4+5) CD8⁺ zytotoxische T-Zelllyse von mit A9I^{p24} „gepulsten“ P815 Zielzellen. (A) Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort von sekretorischem 55kDa Gag Protein mit (pc-ERSyngagMyr- Δ 1) bzw. ohne Anwesenheit einer p40*-Isoform (pc-ERSyngagMyr- Δ 1/142) (B) Vergleich der humoralen und zellulären Immunantwort von sekretorischem 24kDa Kapsidantigen ohne (pc-ERSynp24 Δ 1) bzw. mit Zerstörung der internen Startstelle der p40*-Isoform (pc-ERSynp24 Δ 1/142).

Erwartungsgemäß wurde in allen Fällen aufgrund der *in vivo* Expression sekretorischer Antigene eine deutliche T_H2-polarisierte Immunantwort (IgG1a < IgG2a) induziert. Zudem konnte keine signifikante Veränderung der Gag-spezifischen humoralen Immunantwort beobachtet werden. Während nach Immunisierung von pc-ERSynp24 Δ 1/142, im Vergleich zu pc-ERSynp24 Δ 1, ebenfalls keine Veränderung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort festgestellt

wurde, konnte nach Vakzinierung des Expressionskonstrukts pc-ERsyngag Δ 1/142 gezeigt werden, daß, im Vergleich zu pc-ERsyngagMyr- Δ 1, eine um 50% reduzierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort gegen das p24-spezifische Epitop A9I^{p24/1} *vivo* induziert worden war. Zusätzlich war auch die IFN- γ Freisetzung von mit Peptid restimulierten Splenozyten um den Faktor 2 reduziert.

C.5.4 Zusammenfassung

In den molekularbiologischen Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, daß das HI-virale Pr55^{gag} Polprotein, das myristylierungsdefekte Gag Protein und das 24kDa Kapsidprotein mit Hilfe einer N-terminalen ER-Signalsequenz des adenoviralen 19kDa-E3 Proteins ko-translational in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transloziert und als Sekretproteine von den transient transfizierten Zellen in den Überstand freigesetzt werden können. In einer DNA-Immunisierungsstudie im Balb/c-Mausmodell konnte nachgewiesen werden, daß die *in vivo* exprimierte, sezernierte Form des Kapsidproteins (sc-p24^{KA}), im Vergleich zum zytoplasmatisch lokalisiertem Protein (ic-p24^{KA}), eine um 50% reduzierte zelluläre sowie eine leicht erhöhte (Faktor 1,5) humorale T_H2-polarisierte Immunantwort induzierte. Ferner konnte gezeigt werden, daß nach DNA-Immunisierung der entsprechenden Vektoren, das sekretorische 55kDa Polyprotein (sc-Pr55^{gag}) im Vergleich zum myristylierungsdefektem und intrazellulär lokalisiertem (ic-Pr55^{gag}) sowie auch des partikulären Pr55^{gag}-Proteins (pa-Pr55^{gag}), ein um den Faktor 1,5-2 erhöhte Gag-spezifischen humoralen T_H2-polarisierte Immunantwort induziert, obwohl die induzierten p24-spezifischen ZTL-Antworten, trotz detektierter verringerter IFN- γ Freisetzung von mit Peptid *in vitro* restimulierten Splenozyten, identisch waren. In einer weiteren Immunisierungsstudie konnte gezeigt werden, daß die Mutation der internen Translationsinitiationstelle und infolgedessen der Verlust einer zytoplasmatisch lokalisierten p40* Gag Isoform, zwar keine Bedeutung auf die induzierten Antworten nach Expression des sekretorischen 24kDa Kapsidantigens *in vivo* besitzt, jedoch essentiell für die p24-spezifische CD8⁺ zytotoxische T Zellantwort des Pr55^{gag}-Sekretproteins zu sein scheint.

C.6 DNA-Vakzinierung von „Minigenen“: Induktion isolierter CD8⁺ zytotoxischer T-Zellantworten

Die DNA-Immunisierung und die damit verbundene *in vivo* Expression viraler Fremdproteine und insbesondere regulatorischer Proteine und toxischer Virulenzfaktoren, birgt stets die Gefahr unerwünschter, zytotoxischer Nebeneffekte. Zur Verbesserung der Sicherheit sollten im folgenden DNA-Vakzine Vektoren entwickelt werden, deren Genprodukte eine isolierte, CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort induzieren sollten. Hierzu wurden ausgewählte murine, MHC-Klasse I restringierte Epitope mit einer ER-Signalsequenz versehen, um auf diese Weise eine TAP-unabhängige Translokation von immunogenen Epitopen in das ER und infolgedessen eine Komplexierung mit MHC-Klasse-I Molekülen zu gewährleisten. Die Immunogenität dieser monovalenten Minigene sollte im folgenden im Balb/c-Mausmodell evaluiert werden. Ferner sollte die Minigen-Immunisierung der Vakzinierung des für das Pr55^{gag}V3/IIIB Protein kodierenden Expressionsvektors pc-syngagV3/IIIB gegenübergestellt werden.

C.6.1 Konstruktion der „Minigene“ und Beschreibung der Expressionskonstrukte

Zur Herstellung der Minigene, wurden drei bekannte ZTL-Epitope des murinen Haplotyps H-2^d ausgewählt, wobei zwei in der für das Kapsidprotein p24^{KA} (A9I^{p24/1}: 197-205 aa. bzw. E10Fp^{24/2}: 291- 300 aa.) kodierenden Region des Gag Polyproteins, und eines in der für die V3-Schleife des gp120 Hüllproteins (R10I^{V3/IIIB}: 318-327 aa.) kodierenden *env* Region zu finden sind (vgl. Abb. C-30). Diese Epitope wurden C-terminal an das adenovirale (Ad2) 19kDa-E3 ER-Signalpeptid fusioniert, um eine ko-translationale Translokation der immunogenen Peptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER) zu gewährleisten. Die Genkassetten, die *upstream* des Translationsstart-Kodons (ATG) zusätzlich mit der Konsensus-Kozak Sequenz (5'-GCC GCC ACC-3'; Kozak *et al.*, 1987) sowie *downstream* mit zwei Translationstop-Kodons (TGA TGA) versehen wurden, wurden mittels PCR („Hot Start PCR“) unter Verwendung überlappender Primer hergestellt. Das Gen ER-A9I^{p24/1} wurde unter Verwendung der Primerpaare ER-f1 (5'-cgc cac cAT GAG GTA CAT GAT TTT AGG CTT GCT CGC CCT TGC GGC AGT CTG CAG CGC TGC-3') und ER-gag1/r1 (5'-GGT CTC CTT CAG CAT CTG CAT GGC GGC AGC GCT GCA GAC TGC CGC AAG G-3') sowie ER-f2 (5'-gct cgc tcg aat tcg ccg cca ccA TG-3') und ER-gag1/r2 (5'-cgt cag gct cga gTC ATC AGA TGG TCT CCT TCA GC-3') hergestellt. Aus den Primerpaare ER-f1 und ER-gag2/r1 (5'-CCT GTC CAC GTA GTC CCT GAA GGC CTC GGC AGC GCT GCA GAC TGC CGC AAG G-3') sowie ER-f2 und ER-gag2/r2 (5'-cgt cag gct cga gTC ATC AGA ACC TGT CC-3') wurde das Gen ER- E10Fp^{24/2} synthetisiert. Zur Herstellung der Gensequenz ER- R10I^{V3/IIIB} wurden die Primerpaare ER-f1 und ER-V3/r1 (5'-GGT CAC GAA GGC CCT GCC GGC GCC CCT GGC AGC GCT GCA GAC TGC CGC AAG G-3') sowie ER-f2 und ER-V3/r2 (5'-cgt cag gct cga gTC ATC AGA TGG TCA CGA AGG CCC TGC-3') verwendet. Die auf diese Weise synthetisierten 123-126 bp großen Fragmente wurden anschließend über *EcoRI/XhoI* in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1. kloniert. Zum Vergleich der *in vivo* Immunogenität wurde das DNA-Plasmid pc-syngag-V3/IIIB, welches das C-terminal um die V3-Schleife erweiterte Pr55gag-Polyprotein exprimiert und somit die murinen ZTL-Epitope A9I^{p24/1}, E10Fp^{24/2} und R10I^{V3/IIIB} besitzt, verwendet.

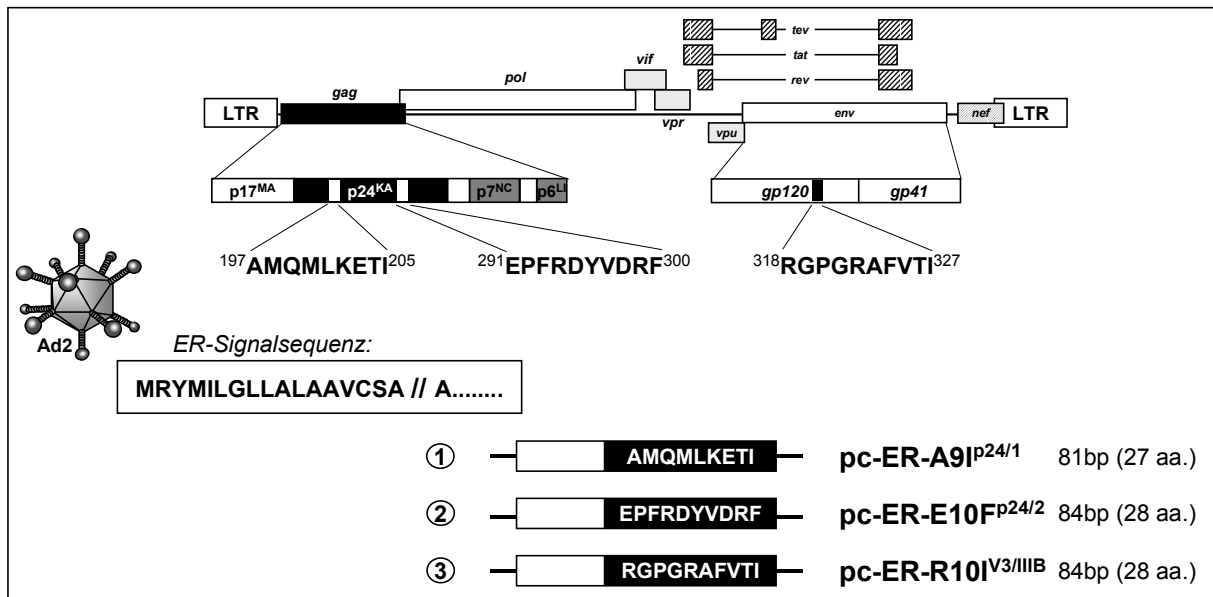


Abbildung C-30 Schematische Darstellung der monovalenten Minigene (1) pc-ER-A9I^{p24/1}, (2) pc-ER-E10F^{p24/2} und (3) pc-ER-R10I^{v3/IIIIB}. Die kodon optimierten Gensequenzen der drei definierten murinen (H-2^d) ZTL-Epitope des HI-viralen 24kDa Kapsidproteins A9I (¹⁹⁷AMQMLKETI²⁰⁵) und E10F (²⁹¹EPFRDYVDRF³⁰⁰) sowie des gp120 Hüllproteins R10I (³¹⁸RGPGRFVTI³²⁷) wurden mittels PCR C-terminal an das ER-Signalpeptid des adenoviralen 19kDa-E3 Proteins fusioniert.

C.6.2 Immunogenität von Minigenen in vivo

Zur Evaluierung der Immunogenität der generierten, monovalenten Minigene *in vivo*, wurden Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg der DNA-Plasmide pc-ER-A9I^{p24/1}, pc-ER-E10F^{p24/2} und pc-ER-R10I^{v3/IIIIB} und des für das HI-virale Pr55^{gag}V3/IIIIB kodierenden Expressionsvektors pc-syngagV3/IIIIB i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert und die humorale und zelluläre Immunantwort eine Woche nach der dritten Immunisierung analysiert (vgl. Abb. C-31).

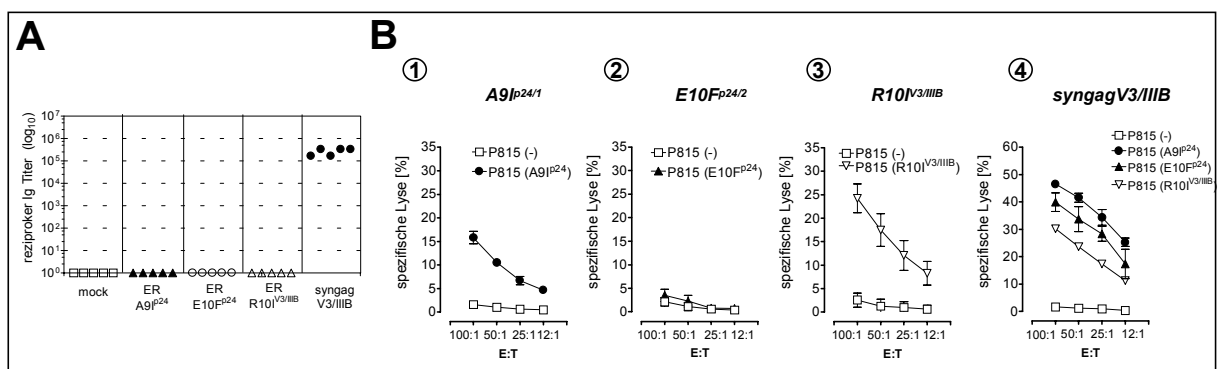


Abbildung C-31 Immunogenität der monovalenten Minigene (1) pc-ER-A9I^{p24/1}, (2) pc-ER-E10F^{p24/2} und (3) pc-ER-R10I^{v3/IIIIB} im Vergleich zur (4) pc-syngagV3/IIIIB DNA-Vakzine. Weibliche Balb/c-Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg der entsprechenden Plasmid-DNA i.m. (*Tibialis anterior*) immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden (A) die Gag-spezifischen Ig-Titer aus dem Serum der Versuchstiere sowie (B) die CD8⁺ zytotoxische T-Zelllyse von mit A9I^{p24} E10F^{p24/2} bzw. R10I^{v3/IIIIB} „gepulsten“ P815 Zielzellen bestimmt.

Während nach der dritten Vakzinierung mit pc-syngagV3/IIIIB Plasmid-DNA Gag-spezifische AK-Titer von durchschnittlich 1:260.000 induziert wurden, konnte in den mit monovalenten Minigenen immunisierten Versuchstieren keine Induktion der humoralen Immunantwort

detektiert werden. Dennoch konnte gezeigt werden, daß nach DNA-Immunisierung von pc-ER-R10I^{V3/IIIB} (25%) und mit geringeren Effizienz auch nach einer Vakzinierung mit pc-ER-A9I^{p24/1} (16%) eine isolierte, gegen das entsprechende Peptid gerichtete CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort, bei einer E.T Ratio von 100:1, generiert wurde. Eine Immunisierung des Minigens pc-ER-E10F^{p24/2} konnte dagegen keine spezifische ZTL-Antwort induzieren. Ferner konnte beobachtet werden, daß, im Vergleich zu den Minigen-Immunisierungen, die durch die *in vivo* Expression des komplexen Pr55^{gag}V3/IIIB Proteins nach Immunisierung von pc-syngagV3/IIIB induzierten ZTL-Antworten generell um den Faktor 2-3 erhöht waren. Ferner wurde die höchsten CD8⁺-spezifische Lyse gegen die murine p24-spezifischen Epitope A9I^{p24} (50%) und E10F^{p24} (40%) nachgewiesen. Die CD8⁺ zellulären Reaktivität gegen das ZTL-Epitop R10I^{V3/IIIB} war dagegen im Vergleich zu dem Epitop A9I^{p24} um den Faktor 3 reduziert (30%).

C.7 Verbesserung der zytotoxischen T-Zellantwort durch Erhöhung intrazellulärer Degradationsereignisse

Die zelluläre Immunabwehr gegen virale Infektionen umfaßt vornehmlich die „Erkennung“ und anschließende Lyse infizierter und Antigen-prozessierender Zellen. Die Degradation zytoplasmatischer, nukleärer, sowie ER-ständiger Antigene erfolgt dabei durch zytosolische Proteasomen. Die auf diese Weise im Zytosol generierten Peptide werden anschließend über membranständige Transportproteine (TAP, „*transporter associated with antigen processing*“) in das Lumen des ERs transportiert und komplexieren dort mit MHC-Klasse I Molekülen, Heterodimere aus einem 45kDa Membranprotein („*class I heavy chain*“) und einem nicht-kovalent assoziiertem β_2 -Mikroglobulin Molekül („*class I light chain*“; β_2m). Dieser trimere, an die Zelloberfläche transportierte Komplex wird von zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt und führt zur Lyse der Antigen-prozessierenden bzw. präsentierenden und somit infizierten Zelle (vgl. Abb. A-7, A). Da somit die Degradation viraler Fremdanigene eine zentrale Stellung bei der MHC-Klasse I vermittelten zytotoxischen T-Zell Antwort einnimmt, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Effizienz und Häufigkeit intrazellulärer Degradationsereignisse mit der Immunogenität des jeweiligen Antigens korreliert. Zu diesem Zweck sollten zunächst Gag-spezifische DNA-Vakzine Vektoren entwickelt werden, deren Genprodukte eine signifikant erhöhte Degradation aufwiesen.

C.7.1 Einfluß von Ubiquitin-Konjugation sowie der „N-End“ Regel auf die Degradation des Gag Proteins

Die nicht-lysosomale und ATP-abhängige Proteindegradation erfolgt in Eukaryonten durch zytosolische, aus mehreren Proteinuntereinheiten bestehenden, hochmolekularen Proteasomen (zur Übersicht: Rivett *et al.*, 1992). Obwohl die Ursachen und Mechanismen selektiver Proteindegradation in eukaryontischen Zellen vielfältig und bislang größtenteils noch unverstanden sind, wurde als wichtigster Ko-Faktor der ATP-abhängigen Proteolyse, das hochkonservierte, 8.5kDa Polypeptid Ubiquitin, beschrieben und charakterisiert (Goldstein *et al.*, 1975; Wilkinson *et al.*, 1980; Ciechanover *et al.*, Herskho *et al.*, 1980). Die „Markierung“ der zu degradierenden Proteine erfolgt dabei durch die kovalente Verknüpfung des C-terminalen Gylzinrestes (Gly₇₆) eines Ubiquitin Monomers mit einem geeigneten Lysinrest (ϵNH_2) des entsprechenden Substrats. Polyubiquitinylierten Proteine, die durch Verknüpfungen mehrerer Ubiquitin-Monomeren generiert werden, werden anschließend von polaren 19S-Komplexen des Proteasomen gebunden, entfaltet und nach Abspaltung der Ubiquitin-Untereinheiten durch Translokation der Polypeptidkette in das katalytische Zentrum der Proteasomen degradiert. Das erste identifizierte Degradationssignal (Degron), welches zur Ubiquitinilierung und proteasomalen Degradation von vermutlich endoproteolytisch gespaltenen und funktionsloser Proteine führt, sind definierte N-terminale basische (Arg, His, Lys) oder hydrophile (Leu, Phe, Trp, Tyr) Aminosäurenreste des entsprechenden Proteins („*N-End Rule*“) (Bachmeir *et al.*, 1986). Im folgenden sollten verschiedenen Expressionsvektoren generiert werden, welche zum einen Ubiquitin-Gag Fusionsproteine exprimierten und zum anderen nach Abspaltung des N-terminalen Ubiquitinrestes eine destabilisierende Aminosäure exponierten. Auf diese Weise sollte das HI-virale Antigen Pr55^{gag} destabilisiert und der proteasomalen Degradation zugeführt werden, um so

die MHC-Klasse I Präsentation und die damit verbundene zytotoxische T-Zell Immunantwort der DNA-Vakzine *in vivo* zu erhöhen.

C.7.1.1 Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte

Ubiquitin wird als Polyprotein exprimiert und post-translational durch eine Isopeptidase in die einzelnen Ubiquitin-Monomere gespalten. Das Gen selbst (accession number M26880) beinhaltet repetitive, kodierende Sequenzeinheiten, so daß eine 228bp-umfassende Ubiquitin cDNA Einheit direkt mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares Ub-1f (5'-**ATG** CAG ATC TTC GTG AAG ACC C-3') und Ub-1r (5'-ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC C -3') aus humaner, genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pcR-ScriptTM subkloniert werden konnte. Anschließend wurden durch PCR unter Verwendung der in nachfolgender Tabelle aufgelisteten Primerpaare verschiedene Ubiquitin und *syngag*, *syngag*(Myr-), *syngag*V3/IIIB bzw. *syngag*(Myr-)V3/IIIB Produkte mit ca. 20bp überlappenden 3' bzw. 5' Enden generiert, und diese mittels einer nachfolgenden Fusions-PCR zu einer einheitlichen kodierenden Sequenz fusioniert. Zusätzlich zur Kozak-Konsensus Sequenz im 5'-nicht-translatiertem Bereich (5'-GCC GCC ACC-3'; Kozak *et al.*, 1987) wurden Restriktionschnittstellen eingefügt, die eine Umsetzung der PCR-Produkte mit Hilfe der Enzyme *EcoRI/XbaI* in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 ermöglichten. Dadurch wurden insgesamt 14 verschiedene Ubiquitin-Gag Expressionskonstrukte hergestellt (vgl. Abb. C-32).

Ubiquitin-Fragmente 1-7		<i>syngag</i> Fragmente 1-7		<i>syngag</i> V3/IIIB. Fragmente 1-7	
forward	reverse	forward	reverse	forward	reverse
Ub_Af	Ub_B1r	Ub_C1f	Ub_Dr	Ub_C1f	Ub_Dr*
	Ub_B2r	Ub_C2f		Ub_C2f	
	Ub_B3r	Ub_C3f		Ub_C3f	
	Ub_B4r	Ub_C4f		Ub_C4f	
	Ub_B5r	Ub_C5f		Ub_C5f	
	Ub_B6r	Ub_C6f		Ub_C6f	
	Ub_B7r	Ub_C7f		Ub_C7f	
Ub_Af	5'-cgc tca <u>GAA</u> <u>TTC</u> GCC GCC ACC ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACC-3'				
Ub_B1r	5'-GGC CCT GGC GCC CAT ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_B3r	5'-GGC CCT GGC GCC CCT CCT CCC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_B4r	5'-GGC CCT GGC GCC CAT CCT CCC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_B5r	5'-GGC CCT GGC GCC CCT CAC CAC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_B6r	5'-GGC CCT GGC GGC CAT ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_B7r	5'-GGC CCT GGC GGC CCT ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC-3'				
Ub_C1f	5'-GGG GGT ATG GGC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C2f	5'-GGG GGT AGG GGC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C3f	5'-GGG AGG AGG GGC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C3f	5'-GGG AGG ATG GGC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C5f	5'-GTG GTG AGG GGC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C6f	5'-GGG GGT ATG GCC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_C7f	5'-GGG GGT AGG GCC GCC AGG GCC AGC-3'				
Ub_Dr	5'-gct cgc a <u>TC</u> <u>TAG</u> <u>ATC</u> ATC AGT TGC AGT GGG CCT GC-3'				
Ub_Dr *	5'-gct cgc a <u>TC</u> <u>TAG</u> <u>ATC</u> ATC ACT GGC TGC TGG GGT CG-3'				

Die dadurch von den jeweiligen Expressionsvektoren exprimierten Fusionsproteine besitzen am Ubiquitin/Gag Übergang unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Die Aminosäuresequenz GG/MG enthält die für die natürliche Abspaltung von Ubiquitin notwendigen Glyzinreste Gly₇₅Gly₇₆. Das freigesetzte Pr55^{gag} Protein wiederum besitzt sowohl den natürliche N-terminalen, stabilisierenden Methioninrest als auch die für die Myristylierung und Freisetzung partikulärer VLPs essentiellen Glyzinrest Gly₂ (pc-Ubsyngag1). Zur Generierung eines „N-End Rule“ Degrons wurde der Methioninrest Met₁ des Pr55^{gag} Proteins zu Arginin Arg₁ mutiert (GG/RC), um so nach Abspaltung der Ubiquitin-Einheit eine destabilisierende Aminosäure zu exponieren und das virale Antigen dadurch der proteasomalen Degradation zuzuführen (pc-Ubsyngag2). Bei den drei restlichen Fusionsproteinen ist die Abspaltung des Ubiquitin durch unterschiedliche Mutationen der Spaltstelle (GR/RC (pc-Ubsyngag3); GR/MG (pc-Ubsyngag4); VV/RC (pc-Ubsyngag5)) blockiert. Die fusionierte Ubiquitin-Einheit sollte hierbei als Initiator einer Polyubiquitinierung dienen. Eine nach Ubiquitin Abspaltung exponierte destabilisierende Aminosäure an Position 1 (Arg₁) sollte auch das myristylierungsdefekte Pr55^{gag} Protein zur proteosomalen Degradation markieren (CG/RA (pc-Ubsyngag7)). Die entsprechende Kontrolle stellt das den Met₁-Rest beibehaltende Fusionsprotein dar (GG/MA (pc-Ubsyngag6)). Die Expressionskonstrukte, die mit V3/IIIB gekennzeichnet sind, besitzen C-terminal eine um die variable Domäne V3 des gp120 Hüllproteins (HIV-IIIB Isolat) verlängerte Proteinsequenz, welches das murine ZTL-Epitop R101^{V3/IIIB} (H-2^d) beinhaltet. Die Mutationen innerhalb der Fusionsübergänge entsprechen dabei den bereits beschriebenen Veränderungen.

Bezeichnung		Ubiquitin Abspaltung	Degradation
① pc-syngag		-	-
② pc-Ubsyngag1		+	-
③ pc-Ubsyngag2		+	„N-end rule“
④ pc-Ubsyngag3		-	Polyub.
⑤ pc-Ubsyngag4		-	Polyub.
⑥ pc-Ubsyngag5		-	Polyub.
⑦ pc-syngagMyr-		-	-
⑧ pc-Ubsyngag6		+	-
⑨ pc-Ubsyngag7		-	Polyub.

Abbildung C-32 Schematische Darstellung und Beschreibung der Expressionsvektoren, welche für verschiedene Ubiquitin-Gag (syngag) bzw. Ubiquitin-Gag^{V3/IIIB} (syngagV3/IIIB) Fusionsproteine kodieren. Die Unterschiede beziehen sich hauptsächlich auf den Ubiquitin-Gag Fusionsübergang, wobei die ursprünglichen Aminosäurereste in grauen Buchstaben und die mutierten Aminosäurereste in schwarzen Buchstaben dargestellt sind. Während die Ubiquitineinheit im Falle der von (2) pc-Ubsyngag1, (3) pc-Ubsyngag2 und (8) pc-Ubsyngag6 kodierenden Proteine abgespalten werden kann, kodieren die Plasmide (4) pc-Ubsyngag3, (5) pc-Ubsyngag4, (6) pc-Ubsyngag5 und (9) pc-Ubsyngag7 für verschiedenen Ubiquitin-Gag Fusionsproteine, die polyubiquitiniert werden sollten. Die von den Plasmiden (2) pc-Ubsyngag1 und (8) pc-Ubsyngag6 exprimierten Proteine besitzen nach Abspaltung des Ubiquitinrestes eine exponierte N-terminale, stabilisierende (Met₁), das von (3) pc-Ubsyngag2 exprimierte Protein eine destabilisierende (Arg₁) Aminosäure. (Ub = Ubiquitin; Polyub. Polyubiquitinierung)

C.7.1.2 Expressionsanalyse Ubiquitin-konjugierter viraler Antigene

In den folgenden Experimenten sollte zunächst untersucht werden, ob die in transient transfizierten Zellen exprimierten, modifizierten Pr55^{Gag} Proteine eine gegenüber dem Wildtyp Gag Protein deutlich verringerte Halbwertszeit ($HWZ_{1/2}$), aufgrund erhöhter Degradationsereignisse, besitzen. Unter der Voraussetzung, daß eine signifikante Verkürzung der „Lebensspanne“, die absolute, intrazelluläre Konzentration der Antigene verringert, wurden humane H1299 Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und die Pr55^{Gag} Expression in den Zellysaten sowohl qualitativ mittels Immunoblot als auch quantitativ im ELISA analysiert. Zudem wurde die extrazelluläre Gag Konzentration in den Zellkulturüberständen quantifiziert, und die Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel in den Überstand transfizierter Zellen überprüft (vgl. Abb. C-33). Nach Transfektion der pc-syngagUb1 Plasmid-DNA konnte sowohl die Expression eines 55kDa Gag-spezifischen Proteins als auch die Freisetzung von VLPs nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, daß der N-terminale Ubiquitin-Anteil erwartungsgemäß abgespalten wurde. Dennoch konnte im Vergleich zu mit pc-syngag transfizierten Zellen beobachtet werden, daß die Gag Konzentration in den Zellen um den Faktor 2 höher, und das Verhältnis zur extrazellulären Menge um ca. 40% reduziert war. Ferner konnte nach Transfektion der pc-syngagUb2 Plasmid-DNA die Expression einer niedermolekulare Gag-spezifische Isoform (< 55kDa) detektiert werden, wobei parallel keine Freisetzung von VLPs nachgewiesen werden konnte. Dies führte zur Annahme einer fehlerhaften Abspaltung des Ubiquitins, wobei die Spaltstelle unbekannt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Transfektion der Vektoren pc-syngagUb3, pc-syngagUb4 sowie pc-syngagUb5 zur Expression stabiler Ubiquitin-Gag Fusionsproteine (> 55kDa), welche nicht als partikuläre Antigene in den Überstand freigesetzt werden, führt. Die Ub-Gag Fusionsproteine konnten allerdings trotz Verwendung unterschiedlicher Ubiquitin-spezifischer Antikörpern durch Western Blot Analyse nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Nach Transfektion von pc-syngagMyr-, pc-syngagUb6 sowie pc-syngagUb7 konnten ebenfalls die Expression von 55kDa Proteine in den Zellysaten nachgewiesen werden. Identische Ergebnisse wurden mit den entsprechenden, C-terminal um die V3-Domäne erweiterten Expressionskonstrukte erzielt (nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, daß keines der beschriebenen Verfahren die Stabilität des *in vivo* exprimierten Pr55^{Gag} Proteins in der Weise beeinflussen konnte, daß die intrazellulär exprimierten Gag Konzentrationen signifikant reduziert worden wären.

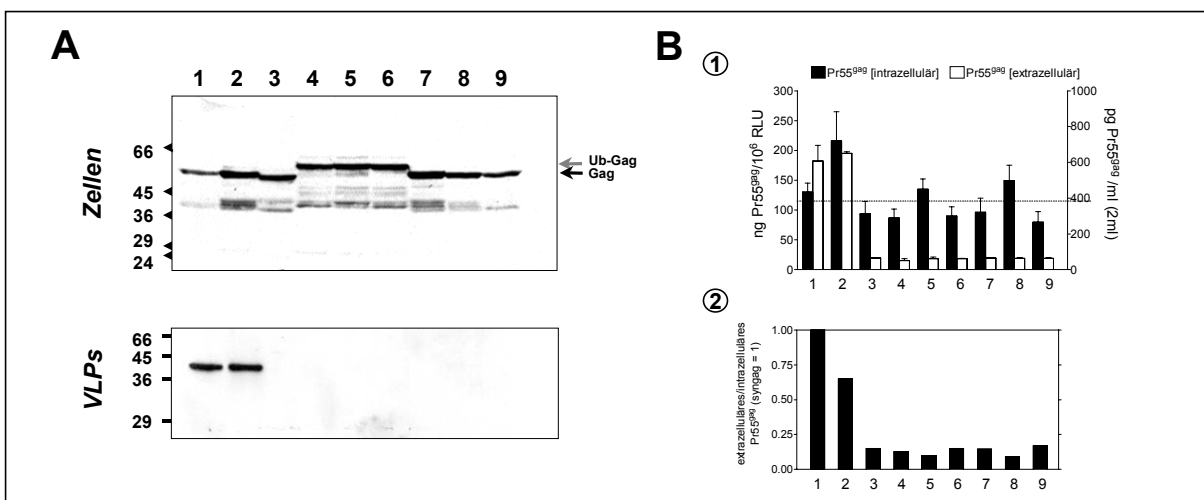


Abbildung C-33 Gag Expressionsanalyse nach Transfektion humaner H1299 Zellen mit (1) pc-syngag, (2) pc-Ubsyngag1, (3) pc-Ubsyngag2, (4) pc-Ubsyngag3, (5) pc-Ubsyngag4 (6) pc-Ubsyngag5, (7) pc-syngagMyr-, (8) pc-Ubsyngag6 und (9) pc-Ubsyngag7. (A) 48h nach Transfektion wurden je 100µg Gesamtprotein der Zellysate sowie ½ Vol. der aus dem Überstand (10ml) aufgereinigten VLPs in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe p24/55-spezifischen Antikörper

(16/4/2, 13/5) durch Western Blot Analyse detektiert. (Gag = 55kDa, Ub-Gag = Ubiquitin-Gag Fusionsprotein > 55kDa) **(B)** 36h nach Transfektion die intrazelluläre Pr55^{Gag} Konzentration in den Zellysaten sowie die extrazelluläre Pr55^{Gag} Konzentration in den Zellkulturübersänden (2ml) mittels p24-spezifischen ELISA quantifiziert. Als interne Kontrolle und zur Normalisierung der ermittelten intrazellulären Pr55^{Gag} Konzentrationen wurde die Zellen mit 1µg des Luciferase-Reporterkonstrukts pGL2-control ko-transfiziert **(1)** Gegenüberstellung der detektierten intrazellulären (ng Pr55^{Gag}/10⁶ RLU) und extrazellulären (pg Pr55^{Gag}/ml) Gag Konzentration 36h nach Transfektion **(2)** Verhältnis der nachgewiesenen extrazellulären und intrazellulären Gag Konzentrationen, wobei der ermittelte Wert nach Transfektion des Vektors pc-syngag = 1 gesetzt wurde.

C.7.1.3 Bestimmung der Halbwertszeit *in vivo* exprimierter Proteine

Zur genauen Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) der Antigene *in vivo*, wurden die humanen H1299 Zellen mit den Expressionsvektoren pc-syngagMyr- und pc-syngagUb7 transfiziert und die über einen definierten Zeitraum (15min) synthetisierten Proteine mit [³⁵S]-Methionin markiert. Anschließend wurde die Abnahme der intrazellulären Pr55^{Gag} Menge in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid über mehrere Stunden hinweg verfolgt, indem das Pr55^{Gag} Polyprotein zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels p24-spezifischen Antikörpern aus den gewonnenen Zellysaten immunpräzipitiert und analysiert wurde (vgl. Abb. C-34).

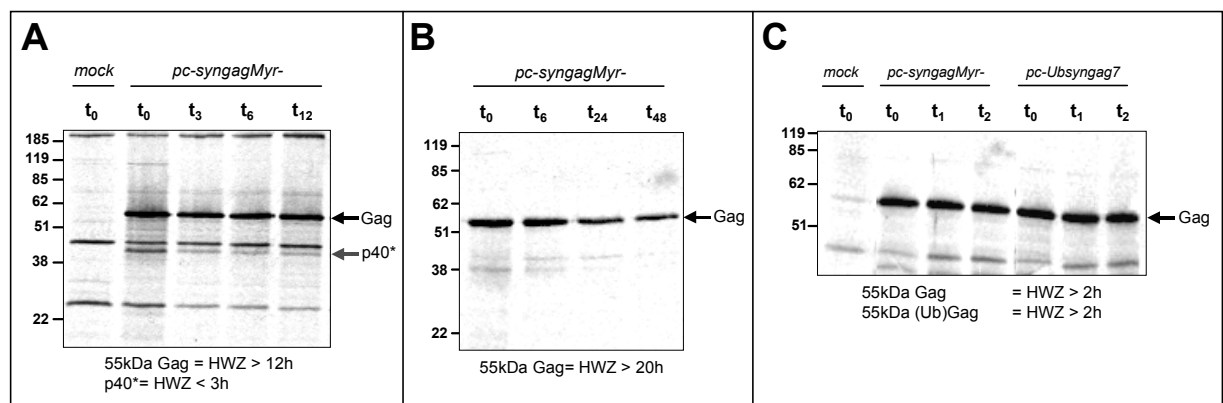


Abbildung C-34 Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ) des Pr55^{Gag} Polyproteins nach Transfektion von H1299 Zellen mit den Expressionskonstrukten pc-syngagMyr- und pc-UbsyngagMyr-. 24h nach Transfektion wurden die über einen Zeitraum von 15min *in vivo* synthetisierten Proteine radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin markiert (t_0) und die Gag-spezifischen Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t_{[h]}$) mit Hilfe p24/55-spezifischer Antikörper (16/4/2; 13/5) aus den gewonnenen Zellysaten immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend in einem 12,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine autoradiographisch detektiert. Die HWZ ist per definitionem derjenige Zeitpunkt, an dem nur noch 50% der zum Zeitpunkt t_0 detektierten Proteinmenge aufgrund zellulärer Degradationsereignisse vorhanden sind. **(A)** Halbwertszeitbestimmung des myristylierungsdefekten 55kDa Gag Proteins (schwarzer Pfeil) sowie der 40kDa Gag Isoform (grauer Pfeil) nach Transfektion von pc-syngagMyr-. **(B)** Halbwertszeitbestimmung von Pr55^{Gag}Myr- (schwarzer Pfeil) in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid (100µg/ml). **(C)** Vergleich der Halbwertszeiten von 55kDa-Gag (schwarzer Pfeil) in mit pc-syngagMyr- bzw. pc-Ubsyngag7 transfizierten Zellen in Anwesenheit von Cycloheximid.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß das myristylierungsdefekte, intrazelluläre HI-virale Strukturprotein Pr55^{Gag} Protein mit einer HWZ_{1/2} von > 20h mit zu den stabilsten Proteinen zählt. Ferner wurde nachgewiesen, daß auch das modifizierte Pr55^{Gag} Protein, welches am N-Terminus anstelle des Methionins ein „destabilisierendes“ Arginin besitzt, mit einer HWZ_{1/2} > 20h stabil ist. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, daß das durch die interne Translationsinitiation (AUG₁₄₂) synthetisierte p40* Protein eine HWZ von weniger als 3h besitzt und somit effizienter degradiert wird als das 55kDa Polyprotein selbst.

C.7.2 Einfluß eines C-terminalen PEST-Degrone auf die Stabilität viraler Antigene

In der nachfolgenden Studie sollte, alternativ zum „N End Rule“-Degron, der Einfluß eines sequenzspezifischen PEST-Degron (zur Übersicht: Rechsteiner und Rogers, 1996) auf die Stabilität der HI-viralen Pr55^{gag} Polyproteins und des 24kDa Kapsidproteins untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Expressionskonstrukte generiert, deren Genprodukte, Pr55^{gag} bzw. p24^{KA}, C-terminal um ein konstitutives, Ubiquitin-unabhängiges PEST-Motif der murinen Ornithin-Decarboxylase (mODC) erweitert waren.

C.7.2.1 Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte

Die C-terminale PEST-Sequenz (aa. 424-450) der murinen mODC (*accession number*: M10624) wurde mittels PCR unter Verwendung der überlappenden Primerpaare mODC_1f (5'-GCT TCC CGC CGG AGG TGG AGG AGC AGG ATG ATG GCA CGC TGC CCA TGT CTT GTG C-3') und mODC_2r (5'-CCT CAT CAG TGA CGG TCC ATC CCG CTC TCC TGG GCA CAA GAC ATG GGC AGC GTG CC-3') sowie mODC_3f (5'-gct cgc tcA GAT CTC ATG GCT TCC CGC CGG GGT GG-3') und mODC_4r (cgc cga gtG GAT CCT CAT CAG TGA CGG TCC-3') synthetisch hergestellt und in den Vektor pcR-Script subkloniert. Das 100bp-umfassende mODC Fragment, welches am 5'-Ende zwei Translationsstop-Kodons (TGA TGA) besitzt, wurden anschließend über BglII/BamHI in die mit BamHI linearisierten eukaryontischen Expressionsvektoren pc-syngagΔStop und pc-synp24ΔStop kloniert. Die auf diese Weise klonierten eukaryontischen Expressionsvektoren **pc-syngagPEST** und **pc-synp24PEST** kodieren demnach für das Pr55^{gag} bzw. p24^{KA} Protein, welches C-terminal um die PEST-Sequenz der murinen Ornithin-Decarboxylase (mODC; (HGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRH) verlängert ist. Am Übergang entstanden aufgrund der BglII/BamHI Hybridrestriktionsschnittstelle (A/GATCT) die Aminosäurenreste Arginin und Serin (.....PSSQ-RS-HGFPP...).

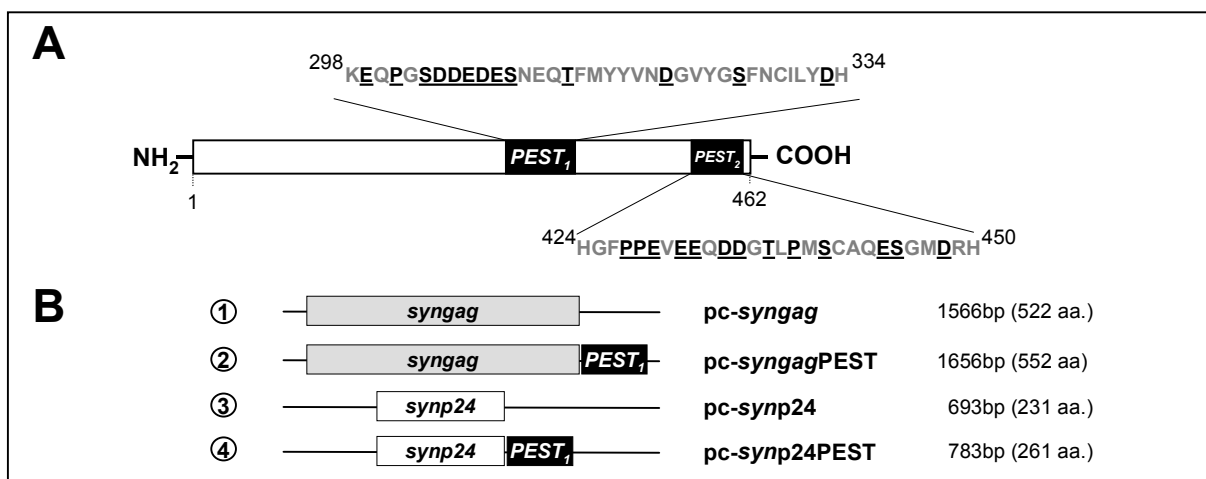


Abbildung C-35 Schematische Darstellung und Beschreibung der Expressionsvektoren **(A)** Lokalisation der Degrons PEST₁ (aa 296-334) und PEST₂ (aa. 424-450) innerhalb der murinen Ornithin-Decarboxylase, mODC (aa- 1-462). **(B)** Darstellung der eukaryontischen Expressionskonstrukte, welche für das Gag Polyprotein **(1)** pc-syngag und **(2)** pc-syngagPEST bzw. das Kapsidprotein **(3)** pc-synp24 und **(4)** pc-synp24PEST kodieren.

C.7.2.2 Analyse der Expression PEST-konjugierter Proteine

Zur Analyse des Einfluß des C-terminalen PEST-Degrans der mODC auf die Stabilität von Pr55^{gag} und des 24kDa Kapsiantigens wurde, die humane Zelllinie H1299, die murinen Zelllinien C₂C₁₂ und 3T3 sowie die Hamsterzelllinie CHO mit den Expressionsvektoren pc-syngag, pc-syngagPEST sowie pc-synp24 und pc-synp24PEST transfiziert und die Expression mittels Western Blot Analyse untersucht (nicht gezeigt). Obwohl nach Transfektion derjenigen Vektoren, die für die C-terminal um das PEST-Degron verlängerten Antigene Gag-PEST bzw. p24-PEST kodierten, höher-molekulare Proteine detektiert wurden, konnte qualitativ keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Demnach konnte gezeigt werden, daß auch nicht eine C-terminale Fusion des PEST-Degrans zur Degradation der äußerst stabilen HI-viralen Strukturproteine Pr55^{gag} und p24^{KA} führte.

C.7.3 Einfluß gezielter Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität viraler Antigene

Neben sequenzspezifischen Degradationssignalen können auch andere Faktoren die Stabilität von Proteinen *in vivo* beeinflussen. So werden z.B. fehlerhaft gefaltete oder verkürzte Proteine einer proteasomalen Degradation zugeführt. In vorausgegangen Arbeiten von Tanja Fitzon und Bernd Leschonsky, konnte im Rahmen von Untersuchungen von die Virusreplikation beeinflussenden Strukturelementen innerhalb des Pr55^{gag}-Polyproteins (Fitzon T., et al. 2000, B.Leschonsky Dissertation IMMh, Regensburg, 2000), gezeigt werden, daß die nicht-konservativen Aminosäuremutationen innerhalb einer Prolin-reichen Region (P₂₃₁→L₂₃₁) bzw. der konservierten MHR („major homology region“-Region (L₃₁₄→H₃₁₄)) zu einer signifikanten Reduktion intrazellulärer und partikulärer Pr55^{gag} Konzentrationen, nach Transfektion der entsprechenden proviralen Konstrukte, führte. In der folgenden Studie sollte der Einfluß dieser singulären Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität des transient exprimierten Pr55^{gag} Polyproteins, des myristylierungsdefekten Pr55^{gag} Proteins sowie des 24kDa Kapsidproteins untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden entsprechend modifizierte Expressionsvektoren hergestellt, und anschließend die Expression in transient transfizierten Zellen analysiert.

C.7.3.1 Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte

Die entsprechenden Expressionskonstrukte, die für Gag bzw das Kapsidprotein p24 mit der entsprechenden „Prolinmutation“ P₂₄₁→L₂₄₁ (M1) bzw. der „MHR-Mutation“ L₃₁₄→H₃₁₄ (M2) kodieren, wurden durch *in vitro* Mutagenese mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare p24M1_f (5'-GAT GAG GGA GCT GCG CGG CAG CGA C-3') und p24M1_r (5'-GTC GCT GCC GCG CAG CTC CCT CATC-3') sowie p24M1_f (5'-GGT TCT ACA AGA CCC ACC GCG CCG AGC-3') und p24M2_r (5'-GCT CGG CGC GGT GGG TCT TGT AGA ACC-3') aus den eukaryontischen Expressionsvektoren pc-syngag, pc-syngagMyr-, pc-synp24^{CA} generiert. Die zur Analyse der Stabilität mutierter Proteine verwendeten Expressionsvektoren sind in Abbildung C-36 schematisch dargestellt.

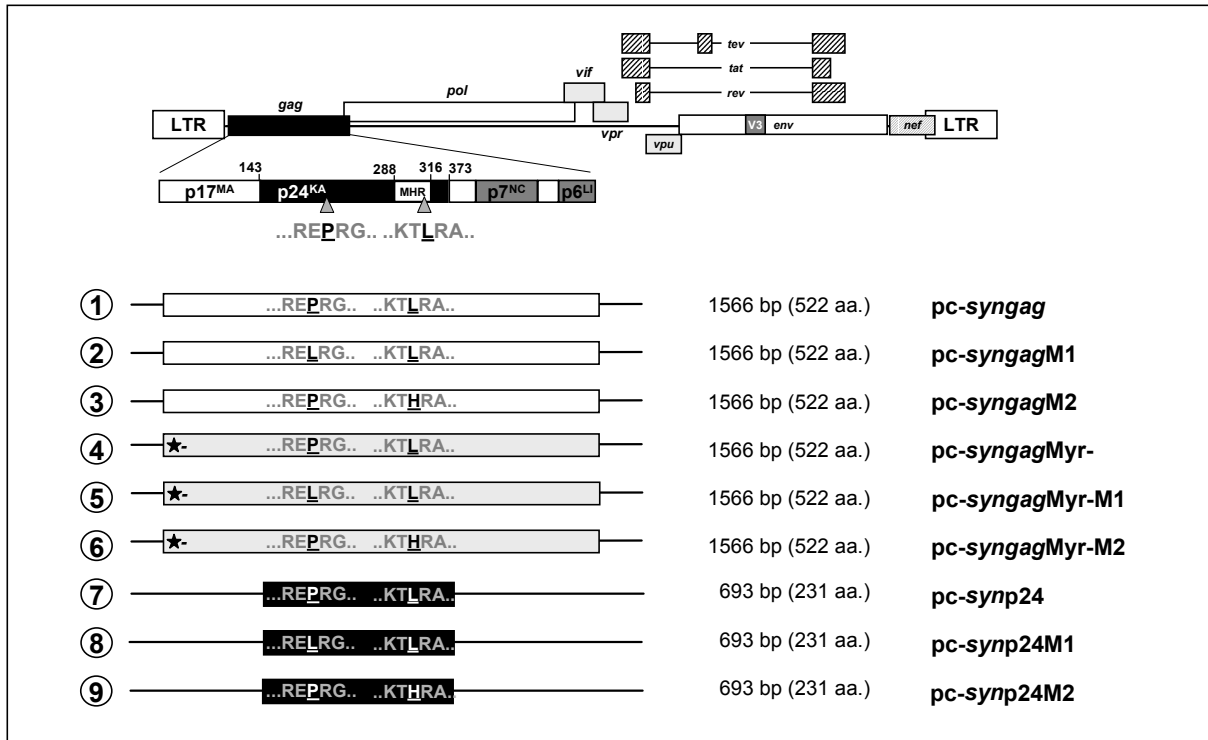


Abbildung C-36 Schematische Darstellung und Beschreibung der Expressionsvektoren (1-9). Mittels *in vitro* Mutagenese wurden die singulären, nicht konservativen Aminosäuresubstitutionen, M1 (P-241-L) bzw. M2 (L-314-H) in die kodierenden Regionen von (1-3) Pr55^{gag} von dem (4-5) myristylierungsdefektem Pr55^{gag} Protein und (7-9) dem Kapsidproteins p24^{KA} eingefügt.

C.7.3.2 Expressionsanalyse mutierter viraler Antigene

In einer gekoppelten Transkription/Translationsreaktion konnte zunächst die Expression gleicher Mengen der viralen 55kDa Polyproteine bzw. 24kDa Kapsidantigene, unabhängig von den jeweiligen internen Aminosäuremutation M1 und M2 *in vitro* nachgewiesen werden. Nach Transfektion der humanen Zelllinie H1299 mit den entsprechenden Expressionsvektoren konnte in einer Western Blot Analyse gezeigt werden, daß die Menge des myristylierungsdefekten Pr55^{gag} Proteins und des Kapsidproteins p24^{KA} durch die Aminosäuresubstitutionen M1 bzw. M2 qualitativ nicht verändert wurde. Im Gegensatz dazu war die intrazelluläre Pr55^{gag} Menge nach Transfektion des Vektors pc-syngagM2, im Vergleich zu mit pc-syngag bzw. pc-syngagM1 transfizierten Zellen, deutlich erhöht. Ferner wurde nach Transfektion der pc-syngagM2 Plasmid-DNA eine verringerte Partikelfreisetzung in den Überstand festgestellt. Die Quantifizierung der Gag bzw. Kapsidproteinen in den Zellysaten und Überständen derjenigen Zellen, die mit pc-syngagM1, pc-syngagMyr-M1 und pc-synp24M1 transfiziert worden waren, ergab wiederholt und auch unter Verwendung zweier verschiedener „p24 Capture ELISAs“ vom Western Blot abweichende Ergebnisse. Dies führte zu der Vermutung, daß die Aminosäure P₂₄₁ für die Erkennung der p24-spezifischen Antikörper essentiell ist und somit die M1-mutierten (P₂₄₁→L₂₄₁) Gag Proteine nicht oder nur unzureichend im ELISA detektiert werden konnten. Mit Ausnahme der genannten M1-Expressionkonstrukte, konnte allerdings das Ergebnis der Western Blot Analyse auch quantitativ im ELISA bestätigt werden. Identische Ergebnisse wurden auch mit der nicht humanen Primatenzelllinie COS-7 und der murinen Zelllinie C₂C₁₂ erzielt. Ferner konnte in einem „Pulse/Chase“-Experiment nach Transfektion von H1299 mit pc-syngagMyr- und pc-syngagMyr-M1 exemplarisch bestätigt werden, daß die Aminosäurenmutation keinen Einfluß auf die Stabilität des 55kDa Proteins hatte. Interessantweise konnte ergänzend zu den Ergebnissen der

Expressionsanalyse mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet werden, daß nach Transfektion von pc-syngagM2, das exprimierte Pr55^{gag} im Vergleich zu mit pc-syngag und pc-syngag-M1 transfizierten Zellen in ungewöhnlichen, konzentrisch ringförmigen Strukturen lokalisiert ist (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis unterstützt die These, daß die Mutation M2 (L₃₁₄→H₃₁₄) innerhalb der konservierten MHR-Region des HI-viralen Polyproteins eine wichtige Rolle bei der Ausbildung oder Freisetzung Virus-ähnlicher Pr55^{gag} Partikel besitzt. Dennoch wurde durch die eingefügten Mutationen M1 und M2 keine Destabilisierung der viralen Antigene beobachtet.

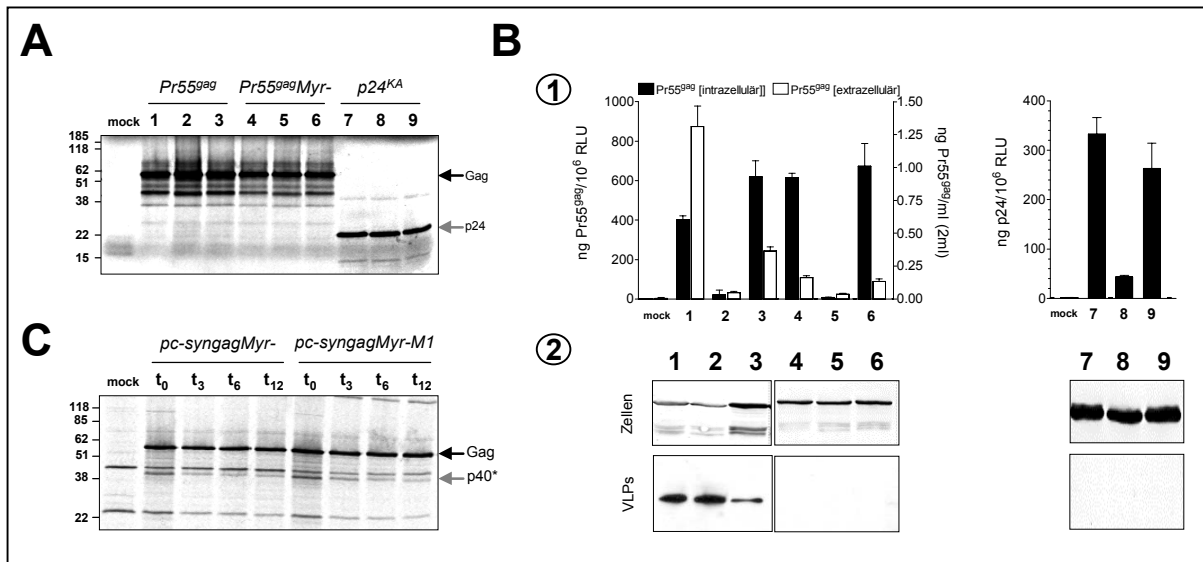


Abbildung C-37 Einfluß der nicht-konservativen, singulären Aminosäuresubstitutionen M1 (P-231-L) und M2 (L-314-H) auf die Stabilität viraler Strukturproteine. **(A)** Gekoppelte in vitro Transkription/Translation (Promega, Mannheim) von je 500ng der jeweiligen Plasmid-DNA. **(B)** Expressions viraler Strukturproteine und Freisetzung Partikulärer VLPs 48h nach Transfektion der humanen Zelllinie H1299 Zellen mit den jeweiligen Expressionsvektoren. Zur internen Kontrolle und Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurden die Zellen mit dem Luziferase-Reporterkonstrukt pGL₂-control (1µg) kotransfiziert **(1)** Quantifizierung der intrazellulären und extrazellulären Gag (ng Pr55^{gag}/10⁶ RLU) bzw. p24 Konzentrationen (ng p24/10⁶ RLU) im ELISA **(2)** Für die Western Blot Analyse wurden je 100µg Gesamtprotein der präparierten Zellsate sowie 1/2Vol. der aus dem Überstand (10ml) aufgereinigten VLPs auf einem 12,5%-igem bzw. 15%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die transfizierten Proteine mittels p17 sowie p24/p55-spezifischer Antikörper (16/4/2, 13/5, 3H7) detektiert. (Gag = 55kDa, p40* = Gag Isoform aufgrund intererener Translationsinitiationsstelle (AUG₁₄₂)) **(C)** Bestimmung der HWZ der Strukturproteine mittels „Pulse/Chase“-Experimenten nach Transfektion von H1299 mit pc-syngagMyr- und pc-syngagMyr-M1. (Expressionsvektoren: (1) pc-syngag, (2) pc-syngagM1, (3) pc-syngagM2, (4) pc-syngagMyr-, (5) pc-syngagMyr-M1, (6) pc-syngagMyr-M2, (7) pc-syngagM2, (8) pc-syngagM2M1 und (9) pc-syngagM2M2; mock = mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen)

C.7.4 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war, mit Hilfe unterschiedlichster Verfahren und Modifikationen die Halbwertszeit der HI-virale Strukturproteine Gag und p24^{KA} zu verkürzen (HWZ=<3min), um so, aufgrund der infolgedessen erhöhten Degradationsereignisse, die MHC-Klasse I restringierte, CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort zu erhöhen. Allerdings konnte weder mit Hilfe N-terminaler Ubiquitinilierungen, destabilisierender N-terminaler Aminosäurereste („N-End“-Regel), des sequenzspezifischen C-terminale PEST-Degrans der murinen Ornithin-Decarboxylase (mODC), sowie vermeintlich „destabilisierender“ Aminosäuremutationen (P241L, L314H) die hohe Stabilität (HWZ=>20h) der Strukturproteine Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr- und p24^{KA} merklich beeinflußt werden. Mittels der in diesen Experimenten durchgeführten Protein-Modifikationen, wie z.B. Ubiquitinilierung und der Aminosäuresubstitution M2 (L₃₁₄→H₃₁₄), wurde ausschließlich die Ausbildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel in den Überstand transfizierter Zellen

blockiert. Da bereits das Versuchsziel *in vitro* nicht erreicht wurde, wurde auf eine zusätzliche *in vivo* Immunisierungsstudie im Balb/c-Tiermodell verzichtet.

C.8 Immunogenität myogener DNA-Vakzine Vektoren

Neben der Verbesserung der Expression und Antigenpräsentation viraler Proteine steht bei der Entwicklung geeigneter DNA-Vakzine Vektoren die Optimierung des Vektorsystems selbst im Vordergrund. Eukaryontische Expressionsvektoren besitzen zumeist einen starken, konstitutiven viralen Promotor, der eine effiziente transiente Genexpression gewährleistet. Für Impfstoffe auf der Basis von DNA-Plasmiden ist allerdings die Verwendung viraler Promotoren, wie z.B. die der humanpathogenen DNA-Viren CMV („cytomegalievirus“), RSV („roux-sarcoma virus“), oder SV40 („simian virus 40“) aufgrund verschiedenster Sicherheitsbedenken fragwürdig. So könnten z.B. die Zelltyp-unabhängigen, unkontrollierbar hohen Expressionsraten aufgrund von Autoimmunreaktionen zu Organschädigungen oder zu einer immunologischen Attenuation gegenüber Fremdanigenen führen. Aus diesem Grund sollte in der folgenden Studie die Effizienz des gewebs,- und differenzierungsabhängigen autologen Promotors der murinen Kreatin-Kinase (MCK; „muscle creatine kinase“) mit der des frühen, viralen hCMV-Promotors sowohl *in vitro* bezüglich der Expressionsraten als auch *in vivo* im Hinblick auf die Induktion einer effizienten Immunantwort gegen das jeweilig exprimierte Antigen im Balb/c-Mausmodell verglichen werden.

C.8.1 Konstruktion und Beschreibung der Expressionskonstrukte

Die Kreatin Kinase der quergestreiften Skelettmuskulatur wird ausschließlich in differenzierten, vielkernigen Muskelzellen (Myotuben) exprimiert. Der die gewebs,- und differenzierungsabhängige Genexpression regulierende, ca. 6.5kb umfassende MCK Promotor besitzt eine Vielzahl von cis-aktiven Elementen, wie z.B. das 206bp umfassende E1-Enhancer Element (-1050 bis -1256 nt.), welches hauptsächlich die muskelspezifische Expression gewährleistet, das Enhancer Element E2 (738 bis 1599 nt.) innerhalb des ersten Introns, den basalen Promotor und weitere vereinzelte Sequenzmotive. Innerhalb des E1 Enhancer Elements befinden sich Bindestellen für ubiquitäre und ebenso für verschiedene muskelspezifische Faktoren, wie z.B. MEF-2, MyoD, Myf5 oder Myogenin, die wiederum erst dann wirksam sind, wenn die Proliferation von Myoblasten zum Stillstand gekommen ist und diese sich zu Myotuben differenzieren (Johnson *et al.*, 1989; Jaynes *et al.*, 1986 und 1988; Sternberg *et al.*, 1988). Für die vergleichenden Untersuchungen konstitutiver und gewebspezifischer Promotoren wurden zunächst geeignete Luziferase-Reporterkonstrukte hergestellt. Dabei wurde der kodierende Bereich der Luziferase unter Kontrolle des 6,5kb Volllänge MCK-Promotors, des verkürzten 1350bp umfassenden MCK-Promotors (-1350 bis +1 nt.), des viralen CMV-Promotor sowie eines MCK/CMV Hybridpromotor, welcher ca 250bp *upstream* der vollständigen, regulatorischen Elementen des CMV-Promotors das für die Muskelspezifität verantwortliche E1-Enhancer Element des MCK-Promotors besitzt, gestellt. Letzteres sollte eine im Vergleich mit dem MCK-Promotor erhöhte und dennoch muskelspezifische Expression ermöglichen. Für die Evaluierung *in vivo* wurden auf der Basis von pcDNA3.1 Vektoren Expressionsvektoren generiert, die das Pr55^{gag} Protein, das myristylierungsdefekte Pr55^{gag} Protein und das p24 Kapsidantigen unter Kontrolle des CMV-Promotors, des 1350bp MCK-Promotor oder des MCK/CMV-Promotor exprimieren (vgl. Abb. C-38).

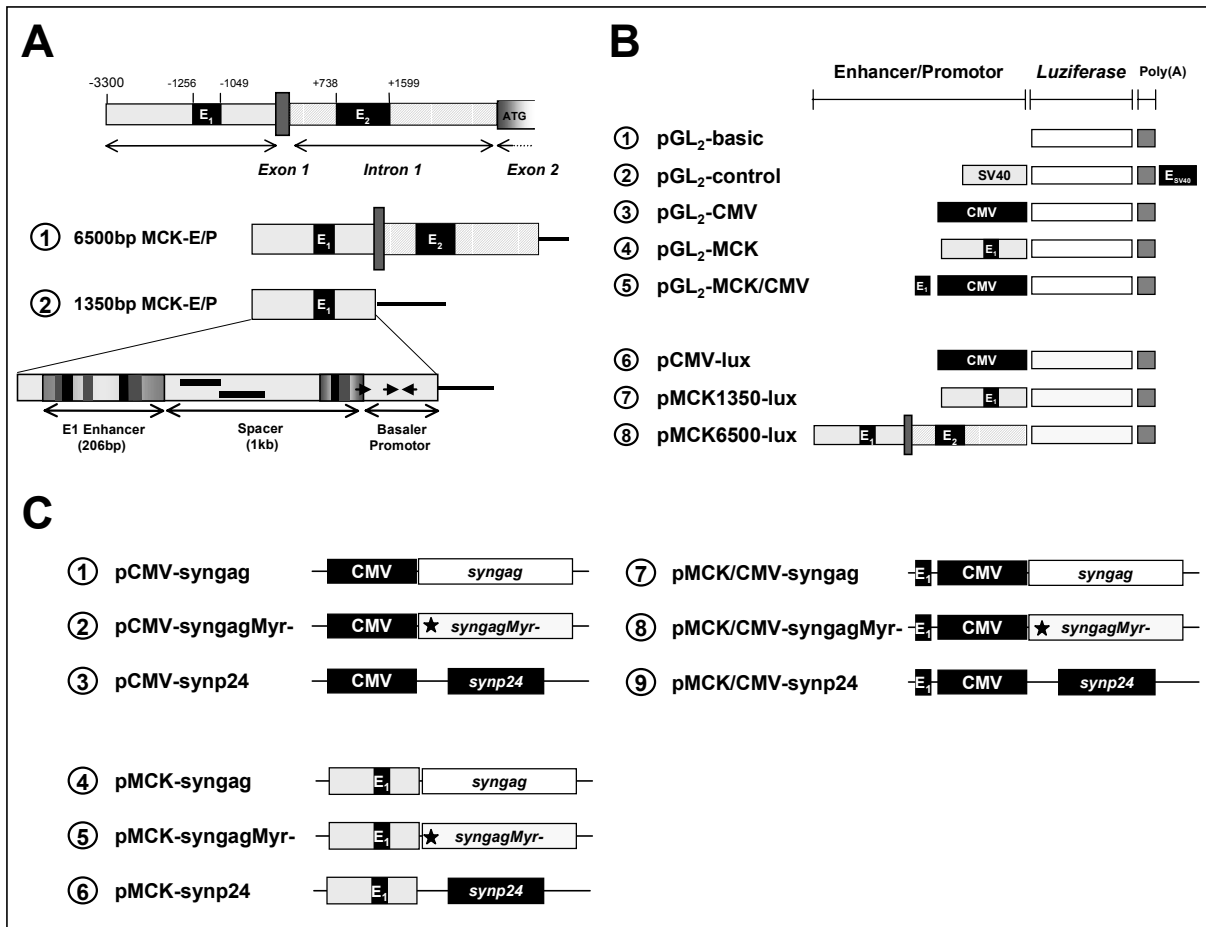


Abbildung C-38 Schematische Darstellung und Beschreibung der Expressionskonstrukte zur Charakterisierung und Evaluierung myogener DNA-Vakzine Vektoren im Vergleich zu herkömmlichen Vektoren (**A**) Schema des muskelspezifischen Enhancer/Promotorbereichs der murinen Kreatin Kinase, MCK („muscle creatine kinase“), welcher für die gewebsspezifische und differenzierungsabhängige Expression verantwortlich ist (E1 = Enhancer 1 (-1050 bis -1256), E2 = Enhancer 2 (738 bis 1599), basaler Promotor, sowie 1kb Spacer Region mit zusätzlichen Bindungsmotiven myogener und ubiquitärer Transkriptionsfaktoren (**B**) Luziferase-Reporterkonstrukte (1-5) auf der Basis der pGL2-Vektoren (Promega, Mannheim) sowie (6-7) der von PD. Dr. H. Lochmüller (Genzentrum, München) zur Verfügung gestellten Vektoren. (**C**) Eukaryontische Expressionskonstrukte auf Basis von pcDNA3.1. zur (1, 4, 7) Expression von Pr55^{gag}, (2, 5, 8) dem myristylierungsdefektem Pr55^{gag} und (3, 6, 8) dem 24kDa Kapsidantigen unter Kontrolle des (1-3) konstitutiven viralen CMV-Promotor, (4-5) des muskelspezifischen MCK-Promotors und (7-9) dem MCK/CMV-Hybridpromotor.

C.8.1.1 Klonierung der Luziferase-Reporterkonstrukte

Zur Bestimmung der Promotoraktivitäten in eukaryontischen Zellkultursystemen wurden verschiedene Luziferase Reporterkonstrukte (vgl. Abb. C-38) auf Basis der pGL2-Basic Vektoren (Promega, Mannheim) kloniert, welcher keine zusätzlichen Enhancer Regionen besitzt. Der „immediate early“ Enhancer/Promotor des humanen Cytomegalievirus CMV (654bp) wurde als 877bp Fragment aus dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III/*Hind*III in den Vektor pGL2-Basic umgesetzt (pGL2-CMV (6,4kb)). Zur Herstellung des entsprechenden Reporterkonstrukts pGL2-MCK, welches die Luziferase unter Kontrolle des murinen, gewebsspezifischen Promotors MCK exprimiert, wurde der 1350bp umfassende MCK-Enhancer/Promotor aus dem Gentherapie-Vektor pAdMCK-1350, welcher freundlicherweise von PD Dr.med. H.Lochmüller (Genzentrum, München) zur Verfügung gestellt wurde, mittels *Bgl*III/*Hind*III in den pGL2-Basic kloniert (pGL2-MCK (6,9kb)). Der gewebsspezifischen Enhancer E1 des MCK-Promotors (205 bp) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primerpaars E1_f (5'-gct cgc tAG ATC TGA TGA GAG CAG CCA C-3') und E1_r

(5'-cct ccg gAG GAT CCA CCA GGG ACA GG-3') aus pAdMCK-1350 amplifiziert, und in den mit *Bgl* II linearisierten Vektor pGl₂-CMV inseriert (pGl₂-MCK/CMV (6,6kb)). Ferner wurden die Luziferase-Reporterkonstrukte pCMVlux (5,5kb), pMCK6.5lux (11,3kb) und pMCK1350lux (6,15kb) von PD Dr.med H.Lochmüller zur Verfügung gestellt (Larochelle et al., 1997).

C.8.1.2 Klonierung der HIV-1 Pr55^{gag} und p24^{KA} Expressionskonstrukte

Der 1350bp MCK Promotor wurde *Bgl* II/*Hind* III aus dem Vektor pAdMCK1350 invers in die MCS („multiple cloning site“) des eukaryontischen Vektors pcDNA3.1 subkloniert (pc-MCK1350_{invers}). Über *EcoRV/Hind* III wurde wiederum der MCK-Promotor in den mit *Nru* I/*Hind* III linearisierten pc-DNA3.1 Vektor umgesetzt (pMCK1350). Der durch PCR amplifizierte Enhancer E1 wurde *Bgl* II/*Bam*HI in den mit *Bgl* II linearisierten Vektor pcDNA3.1 kloniert (pMCK/CMV). Die kodierenden Sequenzen *syngag*, *syngag*Myr-, *synp24*, *syngag*V3/IIIB, *syngag*Myr-V3/IIIB, *synp24*-V3/IIIB wurden aus den entsprechenden pcDNA3.1 Expressionsvektoren (pCMV) *Hind* III/*Xho*I in die Vektoren pMCK1350 und pMCK/CMV umgesetzt. Zur Übersicht sind diese Expressionskonstrukte in Abbildung C-38 schematisch dargestellt.

C.8.2 Zellspezifität und vergleichende Expressionsanalysen myogener DNA-Vakzine Vektoren

C.8.2.1 Charakterisierung der murinen, myogenen Zelllinie C₂C₁₂

Die murine, adärente (C3H) Zelllinie C₂C₁₂ (Yaffe D. und Saxel O., 1977; Blau H. et al., 1983) ist eine Myoblastenzelllinie der Skelletmuskulatur, deren undifferenzierter Zellstatus ausschließlich durch eine geringe Zelldichte, sowie einem Gehalt von 20% FCS im Zellkulturmedium gewährleistet wird. Ein Entzug des Serums und der damit enthaltenen Wachstumsfaktoren in Kombination mit zunehmender Zelldichte (80-85%) induziert die Fusion und Differenzierung der Myoblasten zu kontraktile, vielkernigen Myotuben, welche charakteristische Strukturproteine, Enzyme und Transkriptionsfaktoren exprimieren. In einem Vorversuch wurden C₂C₁₂ Zellen bei geringer Zelldichte ausgesät und nach Erreichen von 80% Konfluenz (24h) in Differenzierungsmedium (DMEM/2% Pferdeserum (HS „horse serum“)) kultiviert. Durch den Nachweis des ausschließlich in differenzierten Muskelzellen exprimierten Mikrofilamentproteins Troponin T (38kDa) und der Morphologie sowie Vielkernigkeit der Zellen konnte der Differenzierungsgrad mittels Immunoblot bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden (nicht gezeigt). Demnach konnte bereits 24h nach Zugabe des Differenzierungsmediums differenzierte Zellen detektiert werden. Ein maximaler Differenzierungsstatus wurde i.d.R. 4 Tage nach Zugabe des Differenzierungsmedium festgestellt. Bei längerer Kultivierung (Tag 6-10) konnte eine Reduktion muskelspezifischer Proteine sowie ein zunehmender Zelltod (>10 Tage) beobachtet werden.

C.8.2.2 Vergleich der Aktivität und Zellspezifität der Promotoren

Zum Vergleich der Aktivität und Zellspezifität der verschiedenen Promotoren wurde die humane Zelllinie H1299, die murinen Zelllinien 3T3 und mKSA, sowie undifferenzierte C₂C₁₂ Myoblasten mit den jeweiligen Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert, und die Luziferase Aktivität nach 36h aus den Zellysaten bestimmt (RLU/μg Gesamtprotein] (vgl. Abb. C-39, A).

Zudem wurden undifferenzierte C_2C_{12} Zellen mit den entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert und zur Analyse der Kinetik der Promotoraktivität über einen Zeitraum von 12 Tagen in Differenzierungsmedium (t_0 - t_{12}) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde dann die Luziferase-Aktivität in den Zellysaten bestimmt (vgl. Abb. C-39, B). In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß der virale CMV-Enhancer/Promotor konstitutiv in allen Zelllinien, sowie unabhängig vom Differenzierungsstatus der Muskelzellen aktiv ist. Im Vergleich dazu, betrug die Aktivität des viralen SV40-Enhancer/Promotors in allen untersuchten Zellen nur durchschnittlich 6-9%. Der MCK-Promotor war dagegen sowohl in humanen als auch in den murinen Fibroblastenzellen 3T3 und mKSA inaktiv. Ferner wurde beobachtet, daß die Aktivität des MCK-Promotors im Vergleich zur detektierten CMV-Aktivität im Verlauf der Differenzierung von C_2C_{12} Myoblasten zu Myotuben von 2% (t_0) auf ca. 50% (t_{12}) gesteigert werden konnte. Somit wurde die differenzierungsabhängige Muskelspezifität des MCK-Enhancer/Promotor im Vergleich zu den konstitutiven, viralen CMV bzw. SV40-Promotoren nachgewiesen. Der Hybridpromotor MCK/CMV besaß dagegen dieselben Eigenschaften wie der CMV-Promotor/Enhancer.

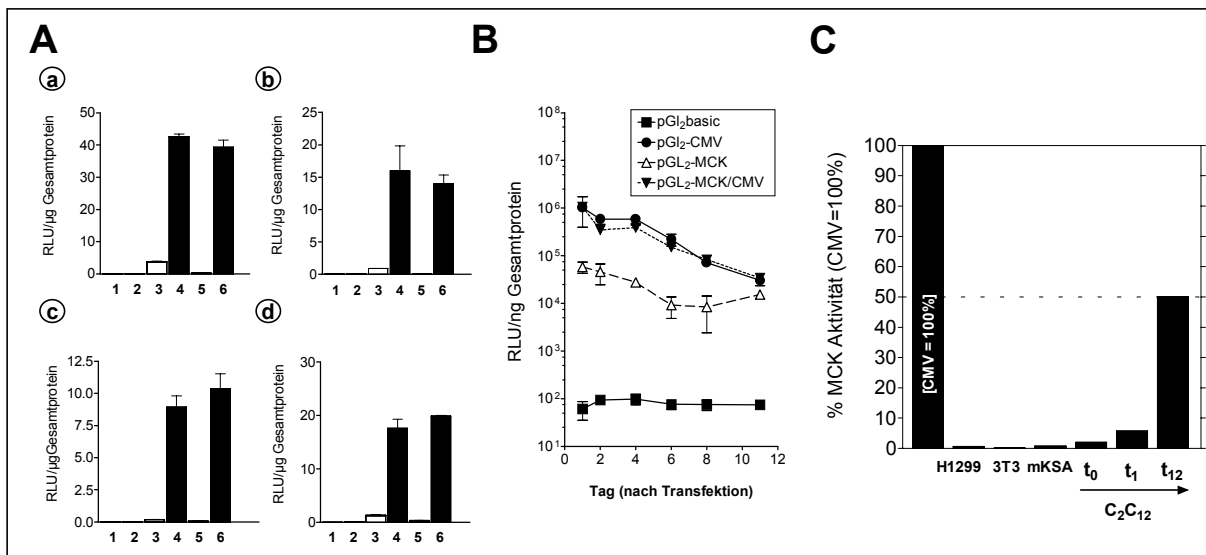


Abbildung C-39 Aktivität und Zellspezifität verschiedener viraler und zellulärer Promotoren. (A) Die (a) humane Zelllinie H1299, die murinen Zelllinien (b) 3T3 und (c) mKSA, sowie (d) murine, undifferenzierte C_2C_{12} Myoblasten wurden mit den entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukten (1) pGL₂-basic, (2) pGL₂-control (SV40-Promotor/Enhancer), (3) pGL₂-CMV, (4) pGL₂-MCK und (5) pGL₂-MCK/CMV transfiziert (1) = nicht transfizierte Zellen). 24h nach Transfektion wurde die Luziferase Aktivität in den Zellysaten bestimmt (RLU/µg Gesamtprotein). (B) Undifferenzierte C_2C_{12} Myoblasten wurden mit den Luziferase-Reporterkonstrukten pGL₂-basic (■), pGL₂-CMV (●), pGL₂-MCK (Δ) und pGL₂-MCK/CMV (▼) transfiziert und für weitere 12 Tage (t_0 - t_{12}) in Differenzierungsmedium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Luziferase Aktivität in den Zellysaten bestimmt. (C) Graphische Zusammenfassung der MCK-Promotor Aktivität (%) im Verhältnis zu der jeweiligen Aktivität des viralen CMV-Promotors (= 100%) in den nicht-myogenen Zellen H1299, 3T3 und mKSA sowie in der Muskelzelllinie C_2C_{12} in verschiedenen Differenzierungsstadien (t_0 , t_1 und t_{12}).

C.8.2.3 Einfluß von IFN- γ auf die Aktivität der Promotoren

Aus der Gentherapie Forschung ist bekannt, daß insbesondere virale Promotoren durch von Immunzellen produzierte und sezernierte Zytokine und Chemokine blockiert werden können (Qin L., et al., 1997; Harms JS und Splitter GA 1995). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die Promotoraktivität des konstitutiven, viralen CMV-Promotors bzw. des muskelspezifischen MCK-Promotors durch IFN- γ beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurde die Luziferase-Aktivität 24h nach Zugabe von unterschiedlichen

Konzentrationen rekombinanten, murinen IFN- γ (0-10ng/ml) in mit pGL₂-CMV bzw. pGL₂-MCK/CMV transfizierten, undifferenzierten C₂C₁₂ Myoblasten bestimmt (vgl. Abb. C-40, A). Zusätzlich wurde die Promotoraktivität 24h nach Zugabe von IFN- γ (0-200ng/ml) in mit pGL₂-CMV, pGL₂-MCK und pGL₂-MCK/CMV transfizierten, differenzierten C₂C₁₂ Zellen (t₆) untersucht (vgl. Abb. C-40, B). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Promotor-Aktivität des viralen, konstitutiven CMV-Promotors und des MCK/CMV-Promotors in undifferenzierten C₂C₁₂ bereits bei einer Konzentration von 0,1ng/ml IFN- γ um durchschnittlich 30% bzw. von 0,5ng/ml IFN- γ um 50% reduziert wurde. Höhere Konzentrationen an IFN- γ hatten keine weitere Repression der Genexpression zur Folge. Im Gegensatz dazu konnte in differenzierten C₂C₁₂ Myotuben erst bei einer Konzentration von ca. 20ng/ml IFN- γ eine maximale Reduktion (50%) der CMV,- bzw. MCK/CMV-Promotor Aktivität detektiert werden. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des muskelspezifischen MCK-Promotors dagegen bereits schon ab einer Konzentration von 10ng/ml IFN- γ um durchschnittlich 75-80% reprimiert wird.

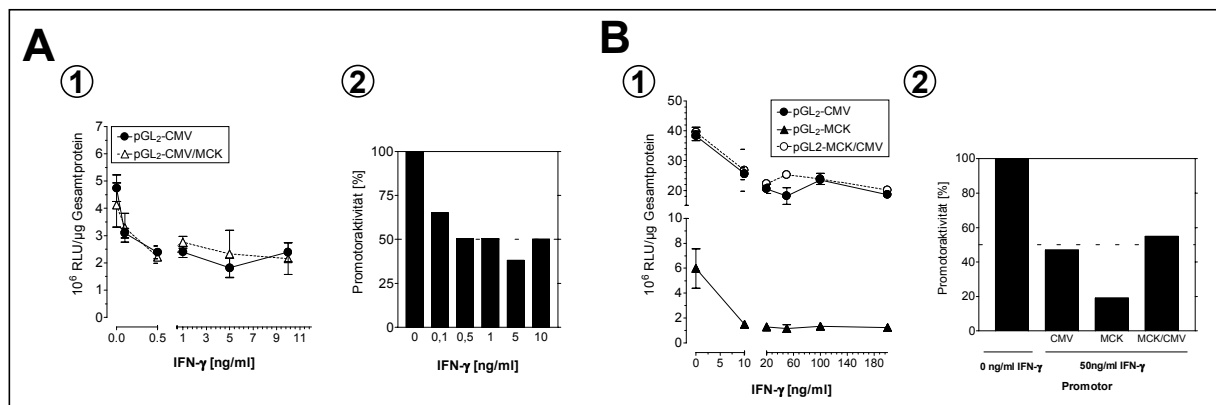


Abbildung C-40 Einfluß von IFN- γ auf die Aktivität viraler und zellulärer Promotoren. **(A)** Undifferenzierte C₂C₁₂ Myoblasten wurden mit den Luziferase-Reporterkonstrukten pGL₂-CMV (●) und pGL₂-MCK/CMV (Δ) transfiziert. 36h nach Transfektion bzw. 24h nach Zugabe von 0, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 oder 10 ng/ml rekombinanten, murinen IFN- γ wurde die **(1)** Luziferase Aktivität in den Zellsaten (RLU/μg Gesamtprotein) bestimmt. **(2)** Graphische Zusammenfassung der Reduktion der durchschnittlichen CMV-Promotoraktivität (%) durch verschiedenen IFN- γ Konzentrationen (0-10ng/ml) **(B)** Undifferenzierte C₂C₁₂ Zellen wurden mit den entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert und weitere 5 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. 24h nach Zugabe von 0, 10, 20, 50, 100 oder 200 ng/ml IFN- γ wurde die **(1)** Luziferase Aktivität bestimmt. **(2)** Graphische Zusammenfassung der Reduktion der CMV,- MCK,- bzw. MCK/CMV-Promotoraktivität (%) in differenzierten Muskelzellen durch 50ng/ml IFN- γ (0 ng/ml IFN- γ =100%).

C.8.2.4 Promotorabhängige Expression viraler Antigene

Zur Analyse der Genexpression der HI-viralen Antigene Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr- und p24^{KA} unter der Kontrolle des CMV-Promotors, des muskelspezifischen Promotors und des MCK/CMV-Hybridpromotors, wurde die humane H1299 Zelllinie und die murinen Zelllinien 3T3 und C₂C₁₂ mit den jeweiligen eukaryontischen Expressionskonstrukten transfiziert und die Expression durch Western Blot Analyse analysiert (Abb. C-41). Dabei konnte gezeigt werden, daß sowohl der CMV-Promotor als auch der Hybridpromotor MCK/CMV unabhängig vom Zelltyp und dem Differenzierungsstatus der Zelle aktiv ist und eine hohe Expression aller viralen Antigene gewährleistet. Eine Antigenexpression unter Kontrolle des muskelspezifischen MCK-Promotors konnte nur in den transfizierten murinen Muskelzelllinie C₂C₁₂ nachgewiesen werden, wobei demgegenüber die Expression in differenzierten Myotuben deutlich gesteigert war. Dennoch konnte, abweichend von den vorherigen Ergebnissen nach Transfektion der entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukten, eine unspezifische, geringe Basalexpression der stabilen, viralen

Strukturproteine in mit den myogener DNA-Vakzine Konstrukten transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden.

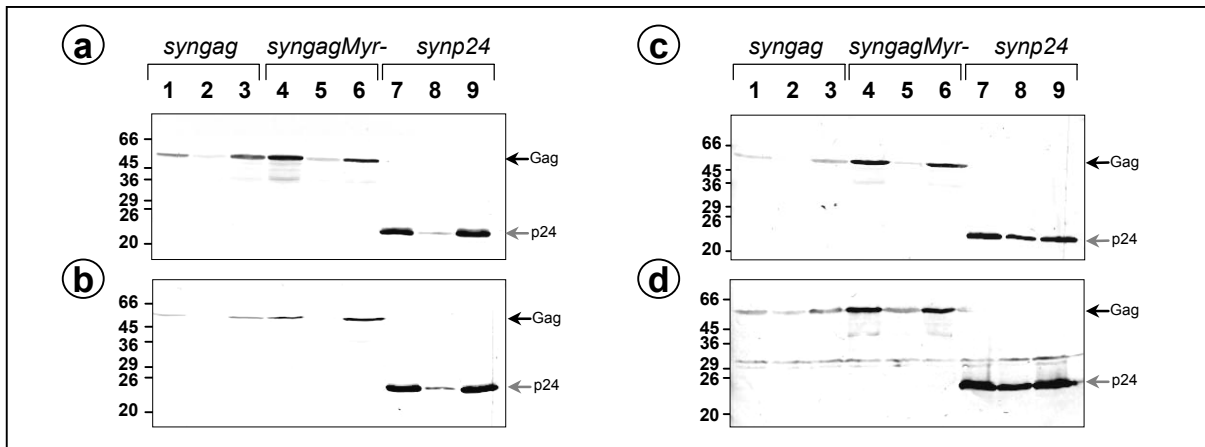


Abbildung C-41 Expression der viralen Antigene Pr55^{gag}, Pr55^{gag}Myr- und p24^{KA} unter Kontrolle des viralen konstitutiven CMV-Promotors, des muskelspezifischen MCK-Promotors sowie des MCK/CMV-Hybridpromotors. (a) humane H1299 Zellen, (b) murine 3T3 und (c) undifferenzierte C₂C₁₂ Myoblasten wurden mit den Expressionsvektoren (1) pCMV-syngag, (2) pMCK-syngag, (3) pMCK/CMV-syngag, (4) pCMV-syngagMyr-, (5) pMCK-syngagMyr-, (6) pCMV/MCK-syngagMyr-, (7) pCMV-synp24, (8) pMCK-synp24 und (9) pMCK/CMV-synp24 transfiziert und nach 36h je 100µg Gesamtprotein der Zellsate über ein 12,5%-iges SDS-PAGE aufgetrennt. Die HI-viralen Strukturproteine wurden mit Hilfe p24/55-spezifischer Antikörper (16/4/2, 13/5) im Immunoblot detektiert. (d) Undifferenzierte C₂C₁₂ Myoblasten wurden –wie bereits beschrieben- transfiziert und 60h in Differenzierungsmedium kultiviert. Anschließend wurde in den differenzierten C₂C₁₂ Myotuben die Expression der viralen Strukturproteine analysiert.

C.8.3 Einfluß gewebespezifischer Expression viraler Antigene auf die Immunogenität *in vivo*

In der folgenden Studie sollte die Auswirkung einer gewebespezifischer im Vergleich zu einer konstitutiven Genexpression auf die Immunogenität zytoplasmatischer sowie freigesetzter, partikulärer HI-viraler Antigene *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden weibliche Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg des jeweiligen Expressionsvektors i.m. (*Tibialis anterior*) immunisiert. Jeweils eine Woche nach der primären, sowie 2 Wochen nach der zweiten bzw. eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Gag-spezifischen AK-Titer im Serum immunisierter Tiere bestimmt. Die zelluläre Immunantwort wurde ebenfalls eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung analysiert.

C.8.3.1 Die Stärke des Promotors korreliert mit der Immunogenität *in vivo*

Um den Einfluß unterschiedlicher Promotoren auf die Immunogenität des partikulären HI-viralen Pr55^{gag} Polyproteins zu untersuchen, wurden die Versuchstiere mit den Expressionskonstrukten pCMV-syngag, pMCK-syngag und pMCK/CMV-syngag immunisiert und zu den angegebenen Zeitpunkten die humorale und zelluläre Immunantwort analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die durchschnittlichen Gag-spezifischen AK-Titer nach 3-maliger Immunisierung der pMCK-syngag Plasmid-DNA (1:5.000-1:20.000) im Vergleich zu mit pCMV-syngag immunisierten Versuchstieren (1:500.000) um den Faktor 20-100 geringer waren. Die AK-Titer der mit dem Vektor pMCK/CMV-syngag immunisierten Tiere (1:500.000) wiesen dagegen keine Unterschiede zu den mit pCMV-syngag immunisierten Mäusen auf. Zudem konnte bei den mit pMCK-syngag und pMCK/CMV-syngag immunisierten Tieren eine geringfügige Verschiebung

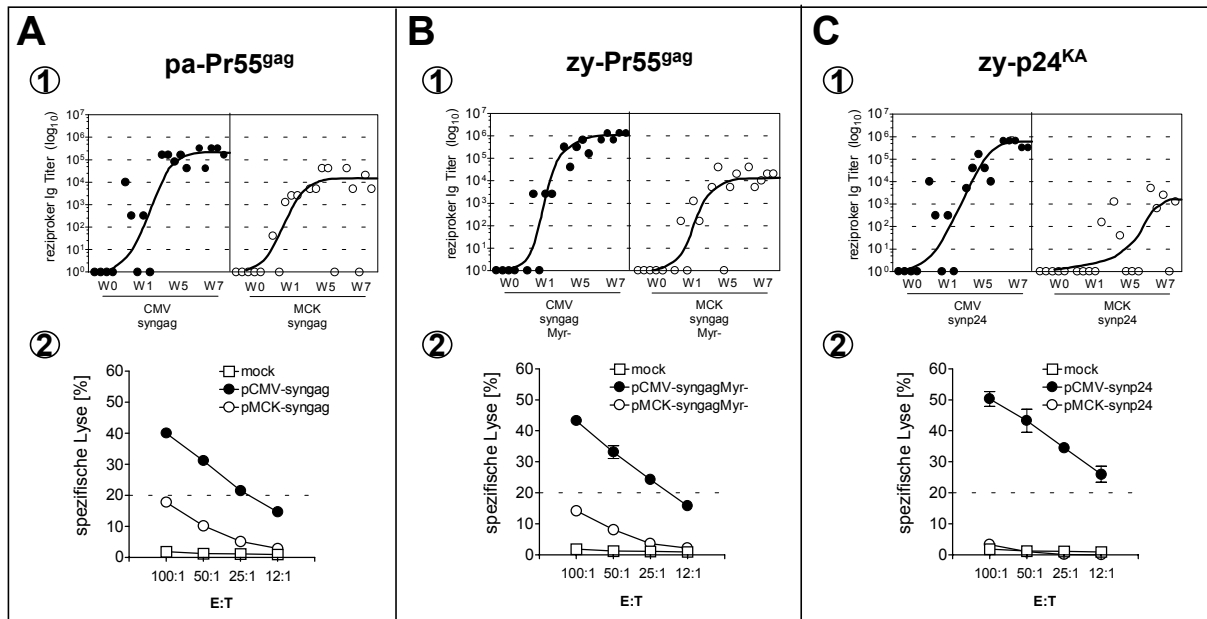


Abbildung C-43 Einfluß der Aktivität und Zellspezifität des Promotors auf die Immunogenität von für (A) das partikuläre Gag Protein (pa-Pr55^{gag}), (B) das myristylierungsdefekte Gag Protein (zy-Pr55^{gag}) bzw. (C) das zytoplasmatische 24kDa Kapsidprotein (zy-p24^{KA}) kodierenden DNA-Vakzine Vektoren. Weibliche Balb/c-Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100µg der Expressionsvektoren pCMV-syngag, pMCK-syngag, pcCMV-syngagMyr-, pMCK-syngagMyr-, pCMV-synp24 sowie pMCK-synp24 i.m. (Tibialis anterior) immunisiert. (1) Gag-spezifische Ig-Titer vor (W0) bzw. 1 Woche nach der ersten, (W2) 2 Wochen nach der zweiten (W5) und eine Woche nach dritten Immunisierung (W7) (2) Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort (Milz) gegen mit dem MHC-Klasse I restringiertem Peptid A9P^{p24/1} „gepulsten“ P815 Zellen eine Woche nach der dritten Immunisierung. (mock = mit pCI-HBsAg immunisierte Balb/c-Mäuse desselben Alters)

Dabei konnte gezeigt werden, daß nach i.m. Immunisierung der pMCK-Vektoren die durchschnittlichen Gag-spezifischen AK-Titer bei partikulärem Gag (pa-Pr55^{gag}) um den Faktor 13 (1:240.000), bei nicht-partikulärem, myristylierungsdefektem Gag Protein (zy-Pr55^{gag}) bereits um den Faktor 50 (1:1.000.000), jedoch bei dem intrazellulärem Kapsidprotein sogar um das 200-fache (1:2.400) geringer waren als nach Immunisierung der entsprechenden pCMV-Vektoren. Zudem konnte beobachtet werden, daß durch eine 2-malige Immunisierung lediglich in 40% der Versuchstiere, die mit pMCK-synp24 immunisiert worden waren eine humorale Immunantwort detektiert werden konnte, während bereits in 80-100% mit pMCK-syngag bzw. pMCK-syngagMyr-immunisierten Tieren spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Ferner konnte beobachtet werden, daß nach Immunisierung der pMCK-Vektoren die durchschnittliche p24-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort (E:T Ratio von 100:1) bei partikulärem Gag (pa-Pr55^{gag}) um den Faktor 2 (18%), bei nicht-partikulärem, myristylierungsdefektem Gag Protein (zy-Pr55^{gag}) um den Faktor 3 (14,2%), jedoch bei dem intrazellulärem Kapsidprotein um das 15-fache (3%) geringer war als nach Immunisierung der jeweiligen pCMV-Vektoren. Obwohl zusammenfassend durch die i.m. Immunisierung der entsprechenden pMCK-Vektoren eine geringere humorale und zelluläre Immunantwort induziert worden war, wurden die geringsten Veränderungen bei denjenigen DNA-Plasmiden beobachtet, die für das partikuläre, in Form von VLPs in den extrazellulären Raum freigesetzte Gag Protein kodierten. Dagegen konnte die größte Reduktion der Gag-spezifischen Immunantwort nach Immunisierung des für das zytoplasmatische 24kDa Kapsidprotein kodierenden Expressionsplasmids pMCK-synp24 festgestellt werden. Aufgrunddessen kann angenommen werden, daß die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren von den jeweiligen Eigenschaften der exprimierten Antigene und insbesondere von der Freisetzung des Proteins abhängig ist.

C.8.4 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Effektivität des gewebspezifischen, zellulären MCK-Promotors mit der des konstitutiven, viralen CMV-Promotors hinsichtlich einer möglichen Verwendung für DNA-Vakzine Vektoren vergleichend zu evaluieren. Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, daß der murine MCK-Promotor ausschließlich in ausdifferenzierten Muskelzellen (Myotuben) aktiv ist. Dennoch war die MCK-Promotoraktivität im Vergleich zu der Aktivität des CMV-Promotors selbst in ausdifferenzierten Muskelzellen durchschnittlich um den Faktor 2-4 geringer. Ferner konnte nachgewiesen werden, daß sowohl der virale CMV,- als auch der zelluläre MCK-Promotor durch das extrazelluläre, pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ (10-20ng/ml) um ca. 50-80% reprimiert wird. In Korrelation mit der ermittelten Promotoraktivität *in vitro*, wurde durch i.m. Immunisierung der pMCK-syngag Plasmid-DNA, welche für das HI-virale partikuläre Pr55^{gag} Protein kodiert, durchschnittlich eine um den Faktor 10 niedrigere Gag-spezifische humorale Immunantwort und eine um den Faktor 2 geringere zytotoxische T-Zellantwort *in vivo* induziert als nach Immunisierung des entsprechenden pCMV-syngag Vektors. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Immunogenität des myogenen DNA-Vakzine Vektors pMCK von der Freisetzung des jeweilig exprimierten Antigens abhängt, da nach Immunisierung der für das intrazelluläre Gag Polyprotein und insbesondere der für das zytoplasmatische Kapsidprotein kodierenden Vektoren eine weitaus drastischere Reduktion Gag-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten detektiert werden konnte als im Vergleich zu den entsprechenden für das partikuläre Gag-Protein kodierenden Vektoren. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Eigenschaften des MCK/CMV-Hybridpromotors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identisch mit denen des CMV-Promotors waren.

C.9 Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das regulatorische HI-virale Tat Protein

Das sehr früh im viralen Replikationszyklus exprimierte 14kDa Regulatorprotein Tat ist essentiell für die Transkription HI-viraler RNAs (vgl. A.2). Zudem induziert exogenes Tat die Aktivierung zellulärer, als auch viraler Promotoren in benachbarten Zellen und wirkt immunmodulatorisch auf Zellen des Immunsystems. Aus diesen Gründen sollten in dem folgenden Projekt unterschiedliche Tat-spezifische DNA-Vakzine Kandidaten entwickelt und gegenüber bisherigen DNA-Impfstoffen hinsichtlich der Expressionseffizienz, Immunogenität sowie der Sicherheit optimiert werden.

C.9.1 Konstruktion und Beschreibung der Expressionsvektoren

Das HI-virale Protein Tat wird von zwei, partiell den *env* Leserahmen überlappenden Exons, Exon1 (5189-5403nt.) und Exon2 (7734-7779nt.), kodiert. Ein Expressionskonstrukt, welches die Wildtyp Tat cDNA des HIV-1 Isolats LAI/IIIB Klon BH10 (*accession number*: M15654) enthält, wurde uns freundlicherweise von V. Bosch (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die kodierende Wildtyp Sequenz (258bp) wurde anschließend unter Verwendung des Primerpaares wtTat/f (5'-gta cat GAA TTC GCC GCC ACC ATG GAG CCG GTA G-3') und wtTat/r (5'- gct atg AGA TCT TTA GCC GTA GCT G-3') mittels PCR Amplifikation und *EcoRI/XhoI* Restriktion in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 umgesetzt, wobei zusätzlich 3' des Translationsstarts ATG die Konsensus Sequenz der eukaryontischen Translationsinitiation [GCC GCC ACC] angefügt wurde (Kozak, 1987) (**pc-wttat**). Zur Verbesserung der Expression hinsichtlich einer Erhöhung der Translationseffizienz wurde weiterhin die kodierende Sequenz an den Kodongebrauch von Säugetieren angepaßt (Matrix: <http://kazusa.or.jp/codon>), ohne jedoch die ursprüngliche Aminosäuresequenz zu verändern. Die Synthese des 285bp umfassenden Gens erfolgte durch Aneinanderfügen mehrerer mittels PCR schrittweise verlängerter Fragmente und wurde als Auftragsarbeit von der Firma GeneArt (Biopark Regensburg) hergestellt. Die kodierende Gensequenz wurde anschließend mittels *EcoRI/XhoI* Restriktion in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (**pc-syntat**) (vgl. Abb. C-44, A). Zur Herstellung eines Gens, welches für ein Tat Protein kodiert, dessen funktionelle Domänen zerstört sind, jedoch ursprüngliche immunogene Epitope beibehalten hat, wurde ein sog. „scrambled“ tat Gen generiert. Dabei wurde am ComputermodeLL die natürliche Aminosäuresequenz des Tat Proteins mehrmals fragmentiert, wobei sieben zum Teil überlappende, ca. 24 Aminosäuren umfassende Peptide (ACEG/BDF) generiert wurden. Diese Fragmente wurden anschließend wieder so aneinander gefügt, daß ursprünglich benachbarte Fragmente so weit wie möglich voneinander entfernt positioniert sind [EBGDAFC]. Die auf diese Weise synthetisch generierte Aminosäuresequenz wurde anschließend unter Berücksichtigung des Kodongebrauchs hoch exprimierter Säugetiergene in eine Gensequenz übersetzt (*scrambled tat*). Zur Vermeidung von Rekombinationen wurde dabei als Matrize für die Fragmente A, C, E und G die optimale, für die überlappenden Fragmente B, D und F die zweitbeste Kodonwahl benützt. Die Synthese des Gens (483bp) erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels PCR und wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von S. Neckermann bei GeneArt (Biopark Regensburg), hergestellt. Anschließend wurde das Gen mit *EcoRI/XhoI* in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (**pc-scratat**).

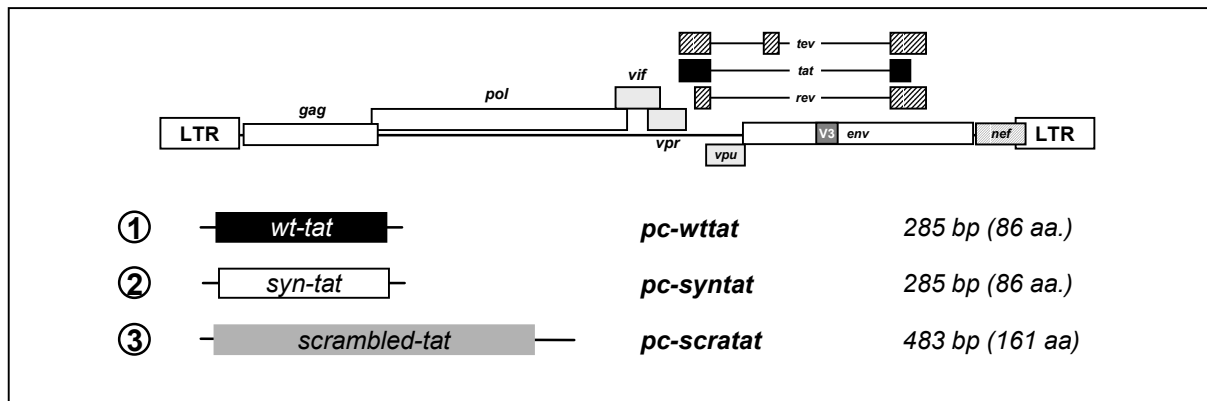


Abbildung C-44 Schematische Darstellung und Beschreibung der (1) für das Wildtyp-Tat Protein kodierenden Expressionsvektors *pc-wttat*, (2) des für das Wildtyp-Tat Protein kodierenden, Kodon-optimierten Vektors *pc-syntat*, sowie (3) des für ein artifizielles „Scrambled-Tat“ Protein kodierenden *pc-scratat* DNA-Plasmids, wobei die Aminosäuresequenz in sieben, überlappenden Peptide fragmentiert (A-F) und nach neugeordneter Zusammensetzung der Fragmente (EBGADFC) unter Berücksichtigung des optimalen (A,C,E,G) bzw. der zweitbesten Kodonwahl (B,D,F) in das „scratat“ Gen übersetzt und synthetisch hergestellt wurde.

C.9.2 Analyse der Genprodukte der DNA Vakzine Vektoren

Um die Funktionalität der entwickelten Expressionsvektoren *pc-wttat*, *pc-syntat* und *pc-scratat* zu überprüfen, wurde die Expression zunächst *in vitro* durch eine gekoppelte Transkription/Translationsreaktion analysiert. Weiterhin wurden die RNA-Synthese bzw. der RNA-Export durch *Northern Blot* Analysen sowie die Proteinexpression durch *Western Blot* Analysen in verschiedenen mit den jeweiligen Expressionsvektoren transfizierten eukaryontischen Zellen *in vivo* untersucht. Ferner wurde die Lokalisation der exprimierten Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt und die Funktion und Eigenschaften der Proteine *in vivo* überprüft.

C.9.2.1 Analyse der Tat Expression *in vitro* und *in vivo*

In der *in vitro* Expressionsanalyse (vgl. Abb. C-45, A), bei der die Proteine mit [³⁵S]-Cystein radioaktiv markiert und autoradiographisch detektiert wurden, konnte zunächst gezeigt werden, daß die *pc-wttat* Plasmid-DNA höhere Expressionsraten eines ca. 10kDa großen Genprodukts gewährleistet, als das Kodon-optimierte *pc-syntat* Konstrukt. Ferner wurde als Genprodukt des *pc-scratat* Vektors ein ca. 18kDa „Scrambled“ Tat Protein detektiert. In mit den Vektoren *pc-wttat*, *pc-syntat* und *pc-scratat* transfizierten humanen H1299 Zellen (vgl. Abb. C-45, B) konnte unter Verwendung eines polyklonalen anti-Tat Serums (B. Ensoli, Institut für Virology, Rom, Italien) im Immunoblot die Expression des Wildtyp Tat Proteins sowie des Scrambled Tat Proteins ebenfalls *in vivo* nachgewiesen werden. Ferner konnte hierbei gezeigt werden, daß das *in vivo*, nach Transfektion von *pc-wttat* bzw. *pc-syntat*, exprimierte Wildtyp-Tat ein größeres Molekulargewicht (~ ca. 14kDa) aufwies, als das *in vitro* exprimierte Protein oder das rekombinante 86 aa. umfassende Tat Protein (9,8kDa). Das *in vivo* exprimierte „Scrambled“-Tat Protein hatte dagegen eine den *in vitro* Expressionsdaten entsprechende Größe von ca. 18kDa. Zur weiteren Analyse der Genexpression wurde die humane Zelllinie H1299 sowie die murinen Zelllinien 3T3 und C₂C₁₂ mit den jeweiligen Expressionsvektoren transfiziert und die Expression von *in vivo* radioaktiv markierter Tat Proteine analysiert (vgl. Abb. C-45, C). Dabei konnte gezeigt werden, daß insbesondere in den murinen Zellen die Expressionsrate des Wildtyp Tat Proteins, nach Transfektion von *pc-syntat* im Vergleich zu mit *pc-wttat* transfizierten Zellen, signifikant erhöht

war. Auch in der mit pc-syntat transfizierten humanen Zelllinie H1299 konnte eine leichte Erhöhung der intrazellulären Tat Konzentration nachgewiesen werden. Zudem konnte festgestellt werden, daß lediglich in den murinen Zelllinien nach Transfektion des pc-syntat Vektors zwei Tat-spezifische Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts exprimiert wurden.

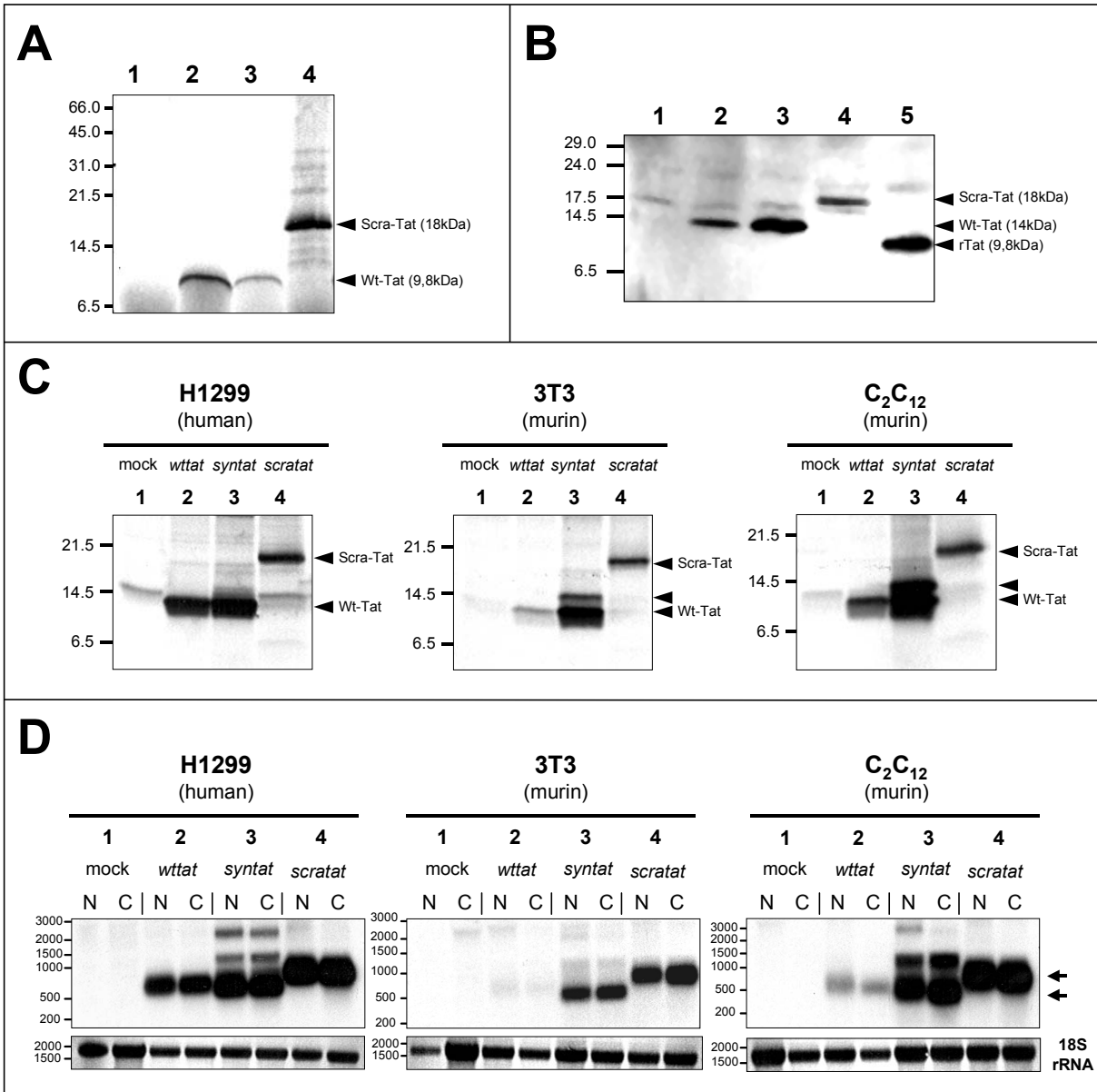


Abbildung C-45. Analyse der *in vitro* und *in vivo* Proteinexpression sowie der RNA-Synthese und des RNA-Exports. **(A)** Je 500ng der entsprechenden Plasmid-DNA wurde für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die exprimierten Proteine wurden dabei mit [³⁵S]-Cystein markiert. **(B)** Die humane Zelllinie H1299 wurde mit (1) pcDNA3, (2) pc-wttat, (3) pc-syntat und (4) pc-scratat transfiziert und nach 36h je 100µg Gesamtprotein bzw. (5) 500ng eines aus *E.coli* aufgereinigten, rekombinanten 86 aa. Tat Proteins (MRC) in einem 17,5%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden spezifisch mittels einem polyklonalem anti-Tat Serum im Immunoblot detektiert. **(C)** Die humane Zelllinie H1299 und die murinen Zelllinien C₂C₁₂ und 3T3 wurden mit den Vektoren (1) pcDNA3, (2) pc-wttat, (3) pc-syntat und (4) pc-scratat transfiziert und 4h mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die exprimierten Proteine spezifisch mit Hilfe Tat-spezifischer monoklonaler Antikörper (ID9D5, NT32D11) aus den Zellysaten immunpräzipitiert, das Präzipitats in einem 17,5%-igem SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine autoradiographisch detektiert. **(D)** Die humane Zelllinie H1299 und die murinen Zelllinien C₂C₁₂ und 3T3 wurden mit den Vektoren (1) pcDNA3, (2) pc-wttat, (3) pc-syntat und (4) pc-scratat transfiziert: 36h nach Transfektion wurde die Gesamt-RNA sowohl aus dem Zellkern als auch aus dem Zytoplasma isoliert und je 10µg Gesamt-RNA (H1299) bzw. 20µg Gesamt-RNA (3T3, C₂C₁₂) elektrophoretisch aufgetrennt. Die spezifischen RNA-Spezies (tat: ca. 500-600; scratat: ca. 700-900) wurden durch Northern-Blot Verfahren mit Hilfe eines 1:1:1 Gemischs wt-, syn- und scrambled Tat-spezifischer, mit [³²P]-radioaktiver RNA-Sonden nachgewiesen. Die jeweilige Menge an 18S rRNA diente hierbei als interne Kontrolle.

In Korrelation mit den detektierten Proteinmengenverhältnissen wurde in den murinen Zelllinien nach Transfektion von *pc-wttat* eine weitaus geringere Menge Tat-spezifischer RNA Transkripte im Zellkern nachgewiesen, als nach Transfektion von *pc-syntat*. Allerdings konnte beobachtet werden, daß die *wttat*,- bzw. *syntat*-spezifischen RNAs sowohl in den humanen als auch murinen Zellen in das Zytoplasma exportiert wurden. Ferner konnte gezeigt werden, daß sowohl die RNA-Synthese, der RNA-Export als auch die Synthese des „Scrambled“ Tat Proteins nach Transfektion der *pc-scratat* Plasmid-DNA unabhängig von Zelltyp-spezifischen Faktoren gewährleistet wurde.

C.9.2.2 Lokalisation des Wildtyp,- und „Scrambled“-Tat Proteins

Das Wildtyp Tat Protein besitzt eine charakteristische, basische Kernlokalisierungssequenz [RKKRRQRRR] innerhalb des ersten kodierenden Exons (49-57aa.), welche die nukleäre Lokalisation *in vivo* gewährleistet (Ruben *et al.*, 1989; Hauber *et al.*, 1989). Die Überprüfung der Lokalisation des Wildtyp Tat Proteins bzw. des Scrambled Tat Proteins in mit den entsprechenden Expressionskonstrukten *pc-wttat*, *pc-syntat* und *pc-scratat* transfizierten humaner H1299 Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (vgl. Abb. C-46). Dabei wurde nach Transfektion der für das Wildtyp Protein kodierenden DNA-Plasmide *pc-wttat* bzw. *pc-syntat* die überwiegend nukleäre Lokalisation des Tat Proteins bestätigt werden. Dennoch konnte in einigen Fällen das Wildtyp Tat Protein im Zytoplasma detektiert werden, wobei hierbei eine punktförmige Verteilung zu beobachten war. Dagegen konnte in mit *pc-scratat* transfizierten Zellen das „Scrambled“-Tat Protein ausschließlich im Zellkern, in deutlich abgegrenzten nukleären subzellulären Kompartimenten, lokalisiert werden. Somit konnte das artifizielle Genprodukt der *pc-scratat* Plasmid-DNA als nukleäres Protein identifiziert werden.

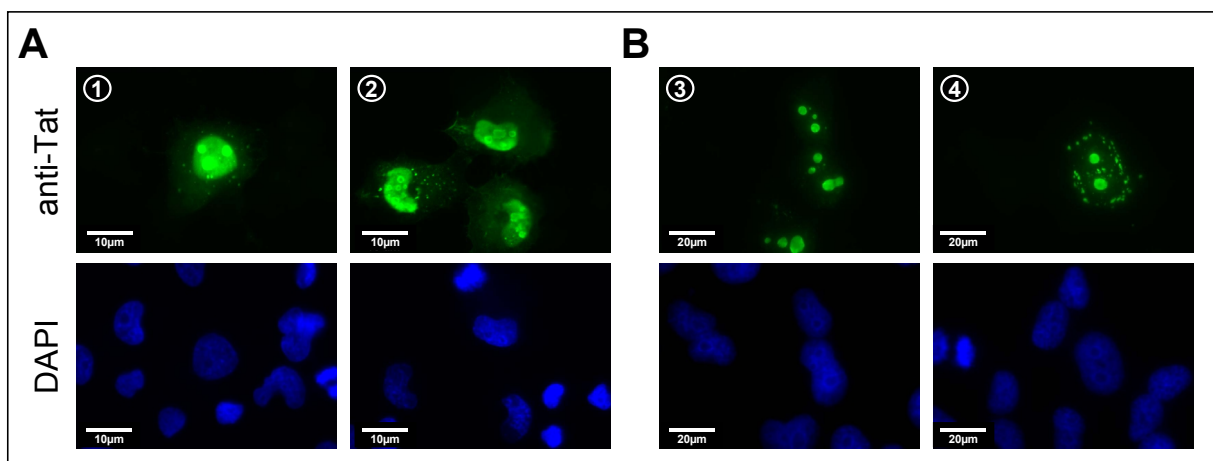


Abbildung C-46 Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung (A) des Wildtyp Tat Proteins und (B) des „Scrambled“-Tat Proteins. Die humane Zelllinie H1299 wurde mit den Expressionsvektoren (1) *pc-wttat*, (2) *pc-syntat* und (3+4) *pc-scratat* transfiziert. 36h nach Transfektion wurden die Zellkerne unspezifisch mit DAPI angefärbt und die subzelluläre Verteilung der exprimierten Proteine mit Hilfe monoklonale Tat-spezifischer Antikörper (ID9D5, NT32D11) in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

C.9.2.3 Analyse der trans-aktivierenden Eigenschaften *in vivo*

Einer der wichtigsten Funktionen des viralen Regulatorproteins Tat ist die Aktivierung der viralen Transkription am LTR Promotor durch die Bindung der RNA-Haarnadelschleife TAR sowie die Interaktion mit weiteren zellulären Faktoren (vgl. A.2). Um nun zu überprüfen, ob das

veränderte „Scrambled“-Tat Protein im Vergleich mit dem Wildtyp-Tat Protein in der Lage ist, die Transkription am viralen LTR-Promotor zu aktivieren, wurde zunächst die humane Indikatorzelllinie CD4/LTR β -Gal-HeLa mit den Expressionskonstrukten pc-wttat, pc-syntat und pc-scratat transfiziert und die Expression der β -Galaktosidase, als Maß für der Aktivierung des viralen Promotors, mittels chromogener Detektion in der Durchlichtmikroskopie analysiert. (vgl. Abb. C-47, A). Ferner wurde die humane Zelllinie H1299 mit dem Reporterkonstrukt pLTR-CAT sowie den jeweiligen Tat-Expressionsvektoren ko-transfiziert, und die CAT-Expression über eine Zeitspanne von 96h im ELISA quantifiziert (vgl. Abb C-47,B).

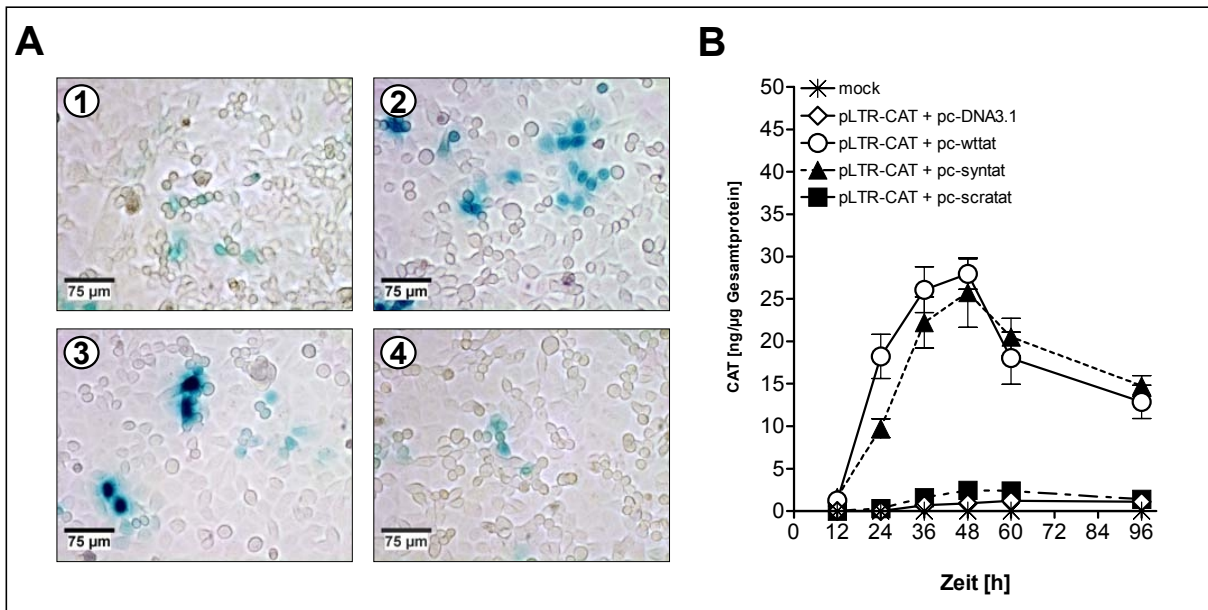


Abbildung C-47 Analyse der aktivierenden Eigenschaften des Wildtyp Tat Proteins und des „Scrambled“-Tat Proteins *in vivo*. (A) Für den MAGI-Assay wurde die CD4⁺-Indikatorzelllinie HeLa- β -Gal mit (1) pcDNA3, (2) pc-wttat, (3) pc-syntat und (4) pc-scratat transfiziert. Nach 36h wurde die Zellkerne derjenigen Zellen, welche die β -Galaktosidase exprimierten, mittels einer Substrat- und Färbelösung spezifisch angefärbt und die Blaufärbung mikroskopisch detektiert. (B) Humane H1299 Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pLTR-CAT und den jeweiligen Tat-Expressionskonstrukten im Verhältnis 1:2 ko-transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (t_{12} - t_{96}) wurde die CAT-Expression aus den gewonnenen Zelllysaten im ELISAs quantifiziert (ng CAT/ μ g Gesamtprotein). (mock = nicht transfizierte Zellen)

Dabei konnte in beiden voneinander, unabhängigen Testsystemen übereinstimmend nachgewiesen werden, daß im Gegensatz zum Wildtyp-Tat Protein nach Transfektion von pc-wttat und pc-syntat, das veränderte „Scrambled“-Tat Protein (pc-scratat) nicht in der Lage war, eine LTR-abhängige Transkription und damit die Expression der Reprotergene zu initiieren. So wurde z.B. in mit pc-wttat bzw. pc-syntat transfizierten Zellen die Expression des CAT-Reportergens unter Kontrolle des viralen LTR-Promotors um den Faktor 25-30 gesteigert, während nach Transfektion von pc-scratat über einen Zeitraum von 96h nach Transfektion keine Aktivierung der CAT-Expression detektiert werden konnte.

C.9.3 Vergleichende Immunogenität der Tat-spezifischer DNA Vakzine Kandidaten *in vivo*

Ziel dieser Studie war es, geeignete Tat DNA-Vakzine Kandidaten zu entwickeln, die sowohl eine effiziente humorale als auch zelluläre Immunantwort induziert und gleichzeitig den heutigen Sicherheitsanforderungen genüge leistet. In der folgenden Immunsierungstudie sollte

dementsprechend die Immunogenität der Tat-spezifischen DNA-Vakzine Kandidaten vergleichend evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden Balb/c-Mäuse 3x im Abstand von 3 Wochen mit die Expressionsvektoren pc-wttat, pc-syntat und pc-scratat i.m. (*tibialis anterior*) immunisiert und die humorale und zelluläre Immunantwort zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert.

C.9.3.1 Induktion Tat-spezifischer humoraler Immunantworten

Eine Woche nach der dritten i.m. Immunisierung der Versuchstieren mit je 100 μ g der entsprechenden Tat-kodierenden Plasmid-DNA wurden die Seren der jeweiligen Immunisierungsgruppen vereint und auf das Vorhandensein Tat-spezifischer Antikörper mittels *Dot Blot* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die nach Immunisierung von pc-wttat, pc-syntat und pc-scratat induzierten Antikörper in der Lage waren, rekombinantes Wildtyp Tat-Protein (10ng-1000ng) ohne signifikanten Unterschiede im Immunoblot zu detektieren.

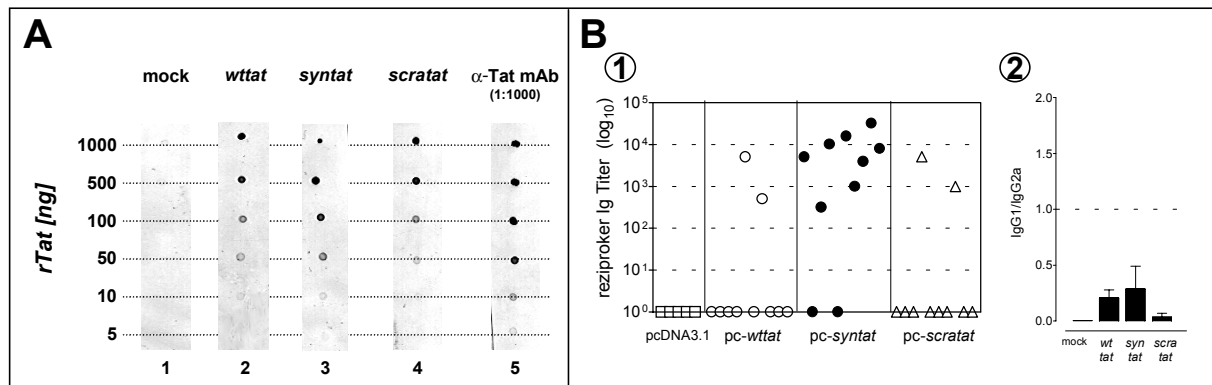


Abbildung C-48 Humorale Immunantwort nach i.m. DNA-Immunisierung verschiedener Tat-spezifischer DNA-Vakzine Kandidaten. Balb/c Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit je 100 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA immunisiert. **(A)** Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die vereinigten Seren einer Gruppe auf Tat-spezifische Antikörper im Dot Blot-Verfahren getestet. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an rekombinantem Tat-Protein (5-1000ng/) in 1 μ l Vol. auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und anschließend mit Hilfe einer 1:200 Serumverdünnung von mit **(1)** pcDNA3, **(2)** pc-wttat, **(3)** pc-syntat bzw. **(4)** pc-scratat immunisierter Mäuse bzw. **(5)** einer 1:1000 Verdünnung der monoklonalen Antikörper ID9D5 und NT32D11 durch Immunoblot Verfahren detektiert. **(B)** Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden **(1)** die Tat-spezifischen Ig-Titer mit den angegebenen DNA-Plasmiden immunisierten Versuchstiere sowie **(2)** das Verhältnis der AK-Isotypen IgG1/IgG2a im ELISA ermittelt.

In weiteren Immunisierungsstudien wurden die Tat-spezifischen Ig-Titer, sowie die AK-Isotypen IgG1 und IgG2a in den Seren einzelner Versuchstiere im ELISA bestimmt. Dabei konnte nur in durchschnittlich 20% der mit pc-wttat bzw. mit pc-scratat immunisierten Versuchstieren Tat-spezifische humorale Immunantworten nachgewiesen werden (1:500-1:2.000). Im Gegensatz dazu wurden in 80-100% der mit pc-syntat immunisierten Mäusen ca. 10-fach höhere Tat-spezifische AK-Titer von durchschnittlich 1:10.000 detektiert. Ferner konnte aufgrund des Verhältnisses der AK-Isotypen gezeigt werden, daß die Immunantwort in allen Versuchstieren T_H1-polarisiert (IgG1<IgG2a) war. In einer weiteren Studie konnte ferner gezeigt werden, daß eine i.m. DNA-Immunisierung von lediglich 20 μ g nicht ausreichte, um unabhängig von dem immunisierten Expressionsvektor eine Tat-spezifische humorale Immunantwort zu induzieren (nicht gezeigt).

C.9.3.2 Induktion Tat-spezifischer zellulärer Immunantworten *in vivo*

Neben den Tat-spezifischen AK-Titer wurden ebenfalls eine Woche nach der dritten i.m. Immunisierung von je 20µg bzw. 100µg der jeweiligen Plasmid-DNA die zelluläre Immunantwort in den präparierten Milzzellen untersucht (vgl Abb C-49).

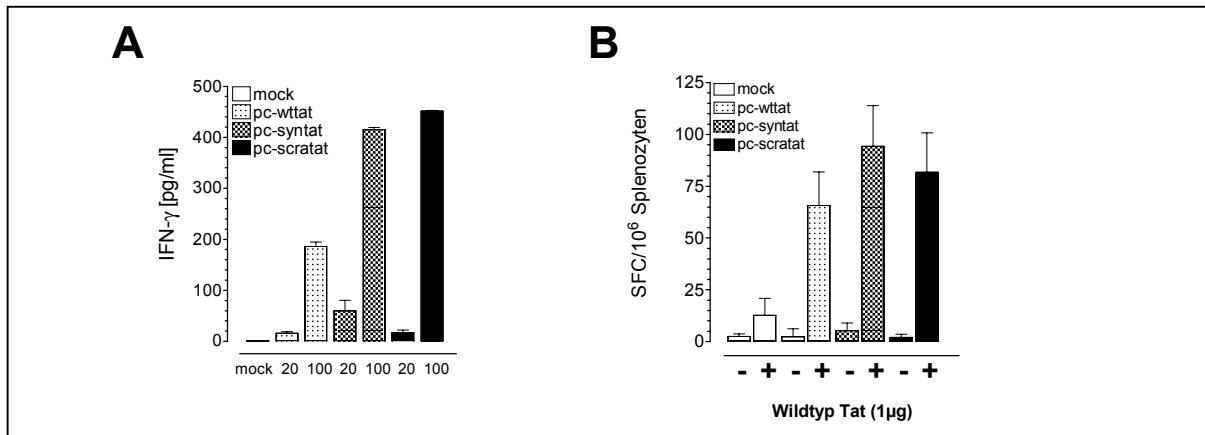


Abbildung C-49 Tat-spezifische zelluläre Immunantwort nach i.m. DNA-Immunisierung. Balb/c-Mäuse wurden 3x im Abstand von 3 Wochen mit der angegebenen Menge (20µg bzw. 100µg) an Plasmid-DNA pc-DNA3 (mock), pc-wttat, pc-syntat und pc-scratat immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die Splenozyten aus den Milzorganen isoliert und (A) die Freisetzung von IFN-γ innerhalb von 48h in den Überstand von mit 500ng rekombinantem Tat Protein *in vitro* restimulierten Splenozyten im ELISA sowie (B) die Anzahl IFN-γ sezernierender Splenozyten nach *in vitro* Restimulation (24h) mit 1µg rekombinantem Tat Protein (ELISPOT-Assay) bestimmt (- = Medium, + = Tat Protein, mock = mit pcDNA3 immunisierte Mäuse; Negativkontrolle)

Nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit 500ng rekombinantem Tat Protein (500ng) restimuliert konnte lediglich die Sekretion des pro-inflammatorische Zytokins IFN-γ, nicht aber die Freisetzung von IL-6, TNF-α, IL-10, IL-4, IL-5 oder IL-12 nachgewiesen werden. In Korrelation mit der humoralen Immunantwort konnte dabei gezeigt werden, daß die IFN-γ Freisetzung derjenigen Versuchstiere, die mit je 100µg des Kodon-optimierten Tat-Plasmids pc-syntat immunisiert worden waren, gegenüber den mit pc-wttat immunisierten Mäusen um den Faktor 2 erhöht war. Dagegen wurden keine signifikanten Unterschiede in der IFN-γ Freisetzung von mit pc-syntat bzw. pc-scratat immunisierten Mäusen detektiert. Bei einer Immunisierungsdosis von je 20µg Plasmid-DNA konnten in mit Tat Protein restimulierten Splenozyten insgesamt nur geringe Mengen an IFN-γ detektiert werden. Dennoch wurde die höchste Menge an in den Überstand freigesetztem IFN-γ in mit pc-syntat immunisierten Versuchstieren nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Anzahl an IFN-γ sezernierenden Zellen (SFC) 24h nach *in vitro* Restimulation mit rekombinantem Tat Protein im ELISPOT-Assay bestimmt. Hierbei konnten die zuvor beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden, obwohl die Unterschiede zwischen den verschiedenen Immunisierungsgruppen weniger signifikant waren.

C.9.3.3 Identifizierung und Vergleich immunogener Epitope

In den folgenden Experimenten sollte zum einen mögliche immunogene, murine B,-und T Zell Bereiche, welche durch die i.m. Immunisierung von für das Wildtyp-Tat Protein kodierenden Vektoren *in vivo* induziert worden waren identifiziert werden. Ferner sollte vergleichend untersucht werden, ob die durch das *in vivo* exprimierte „Scrambled“-Tat Protein induzierten Reaktivitäten gegen die ursprünglichen Epitope beibehalten oder verändert wurden. Zu diesem

Zweck wurden eine Woche nach der dritten i.m. Immunisierung mit je 100 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA die Reaktivitäten der Seren gegen acht überlappende Tat-spezifische Peptide (ca. 20 aa.) untersucht. Dabei konnte lediglich in den mit pc-syntat immunisierten Mäusen eindeutige B-Zell Epitope detektiert werden. Die Serumantikörper detektierten in diesen Fällen zu 100% das Peptid 1 (1-20aa.) sowie zu 50% die Peptide 5 und 6 (41-70aa.) (vgl. Abb. C-50, A). Zusätzlich wurden durch *in vitro* Restimulation der präparierten Splenozyten mit den entsprechenden Peptiden die Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen im ELISPOT-Assay bestimmt. Im Gegensatz zum vorherigen Ergebniss, wurden in allen Immunisierungsgruppen nahezu identische T-Zellreaktivitäten gegen diesselben Bereiche, Peptid 4 und 5 (31-60aa.), nachgewiesen. Dabei waren in allen Versuchstieren die Reaktivität gegenüber dem Peptid 5 (41-60aa.) höher als gegen das Peptid 4 (31-50aa.). Auch hier konnte übereinstimmend mit den vorangegangenen Versuchen eine Abhängigkeit der immunisierten DNA-Menge von der beobachteten T-Zell Aktivität gegen die Peptide 4 und 5 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

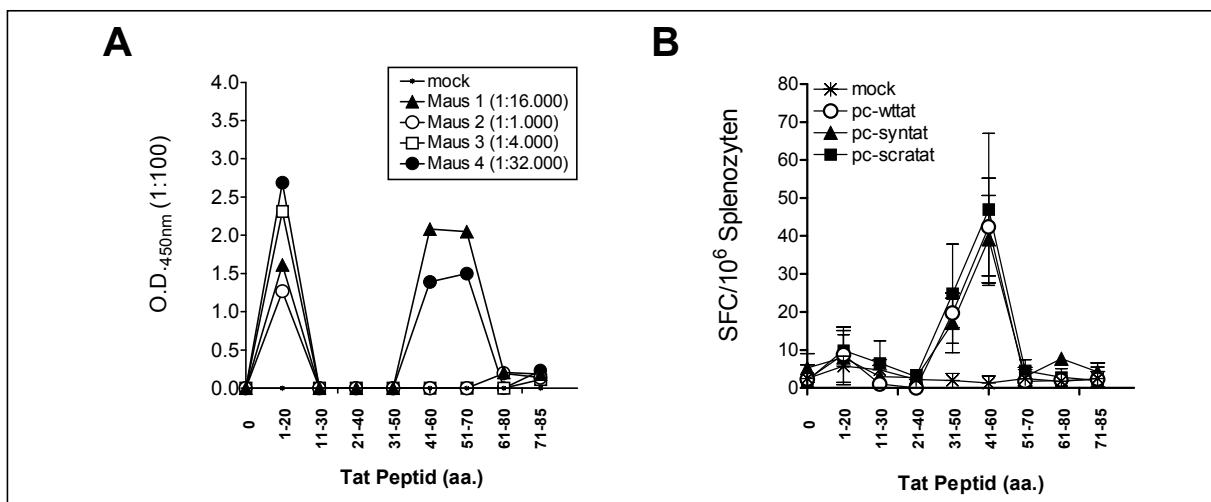


Abbildung C-50 Identifizierung reaktiver Epitope nach i.m. Immunisierung Tat-spezifischer DNA-Vakzine Vektoren. Balb/c-Mäuse wurden mit je 100 μ g pc-wttat, pc-syntat und pc-scratat immunisiert. Eine Woche nach der dritten Immunisierung wurden die immunogenen (A) B-Zellepitope der Serumantikörper (AK-ELISA) in mit pc-syntat immunisierten Versuchstieren (Maus 1-5 (Ig Titer)) sowie (B) zelluläre T-Zell Epitope aus den präparierten Milzzellen (ELISPOT-Assay) mit Hilfe von acht, sich überlappenden Tat_{LAI}-spezifischen Peptiden bestimmt. (mock = mit pcDNA3 immunisierte Balb/c-Mäuse)

C.9.4 Zusammenfassung

Zur Entwicklung einer effizienten DNA-Vakzine gegen das HI-virale Regulatorprotein Tat wurden zunächst die das Wildtyp Tat Protein kodierenden Vektoren pc-wttat bzw. das Kodon-optimierte pc-syntat sowie ein pc-scratat Expressionskonstrukt generiert, welches für ein artifizielles, aus neuangeordneten, sich überlappenden Peptidfragmenten des Wildtyp-Tat Proteins bestehendes „Scrambled Tat Protein kodiert. In den molekularbiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zu mit pc-wttat transfizierten Zellen durch die Anpassung des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen (syntat) die Expressionsrate des 14kDa Genprodukts insbesondere in murinen Zellen deutlich erhöht werden kann. Dementsprechend wurden ebenso geringere Mengen Wildtyp-Tat-spezifischer RNA im Zellkern transfizierter Zellen nachgewiesen. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß das ca. 18kDa „Scrambled“-Tat Protein in mit pc-scratat transfizierten Zellen unabhängig von zellspezifischen Faktoren exprimiert wurde und, ebenso wie das Wildtyp Tat Protein, im Zellkern lokalisiert war. Ferner konnte *in vivo* gezeigt werden, daß das „Scrambled“-Tat Protein im Gegensatz zum Wildtyp-Tat inaktiv und nicht in der Lage war, die Transkription des HI-viralen

LTR-Promotors zu aktivieren. In Immunisierungstudien im murinen Balb/c-Tiermodell konnte gezeigt werden, daß lediglich das *pc-syntat* Plasmid in der Lage war, sowohl eine effiziente humorale als auch zelluläre T_H1-polarisierte Immunantwort zu generieren. Demgegenüber konnte nach Immunisierung der *pc-wttat* und *pc-scratat* Vektoren nur vereinzelt die Induktion Tat-spezifischer Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Dennoch wurden hierbei effiziente Tat-spezifische zelluläre Immunreaktionen detektiert, welche näherungsweise vergleichbar mit den mit *pc-syntat* immunisierten Versuchstieren waren. Während sich die T-Zellreaktivitäten unabhängig von dem jeweilig verabreichtem DNA-Plasmid vornehmlich gegen den zentralen Bereich des Wildtyp Proteins (31-60aa) richteten, erkannten die *in vivo* induzierten Antikörper von mit *pc-syntat* immunisierten Mäusen sowohl den N-terminalen Bereich (1-20 aa.) als auch zentrale Regionen (41-70 aa.) des Tat Proteins.

D Diskussion

D.1 Voraussetzungen zur Entwicklung geeigneter DNA-Vakzine Kandidaten für verschiedene Tiermodelle

Bevor erste klinische Studien am Menschen durchgeführt werden können, muß die Immunogenität und die Sicherheit jedes potentiellen Vakzine-Kandidaten zunächst im Tiermodell, wie z.B. in Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Affen (Makaken, Schimpansen) sichergestellt werden. Letztere sind aufgrund des engen Verwandtschaftsgrads zum Menschen als Tiermodell wohl am geeignetsten. Jedoch wird die Effektivität der meisten Impfstoffe, aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und enormen Anschaffungs,- und Unterhaltskosten höherer Primaten, zuvor in Nagetieren, insbesondere in Mäusen getestet, wobei für diese Zwecke vor allem genetische Inzuchtstämme, wie z.B. Balb/cAnN, C57BL/6 oder DBA/2 verwendet werden, um einen höheren Grad an Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zu erzielen. Die Wahl des Tiermodells und der Spezies hängt dabei meist von dem jeweiligem Pathogen ab, gegen das ein Immunschutz induziert werden soll. Die Verwendung von Tiermodellen und insbesondere die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist insbesondere bei der Entwicklung und Evaluierung potentieller HIV/AIDS-Impfstoff Kandidaten mit einer Vielzahl von Problemen behaftet. Da z.B. das humanpathogene HIV-1 nicht in der Lage ist, sich effizient in Nagetieren, wie z.B. Mäusen, zu replizieren, steht für dieses Tiermodell generell kein Impfvirus („challenge virus“) zur Verfügung, mit Hilfe dessen die Induktion einer schützenden Immunität überprüft werden könnte. Auch in Makaken ist das HIV-1 replikationsinkompetent. Außerdem kann das in Makaken pathogene SIV-Virus, welches AIDS-ähnliche Krankheitssymptome hervorruft, aufgrund der genetischen Divergenzen nicht als Impfvirus einer auf HIV-1 basierenden Vakzine im Menschen verwendet werden. Ausschließlich die Immunogenität von Impfstoffen, die gegen die HI-virale Hüllproteine gerichtet sind, können mit Hilfe eigens entwickelter, chimäre Impfviren (SHIV), welche anstelle der SIV-spezifischen *env* kodierenden Region das entsprechende HIV-spezifische Gen enthalten, im Makakenmodell überprüft werden. Infolgedessen müssen für humane klinische Studien die auf SIV-basierenden Impfstoffe, die zur Austestung in höheren Tiermodellen (z.B. Makaken) entwickelt wurden, auf die humanpathogenen HIV-1 Virusisolate adaptiert werden. Ferner können Schimpansen zwar von HIV-1 infiziert werden, entwickeln allerdings nach Infektion mit dem Impfvirus keine schwerwiegenden Krankheitssymptome. Trotz all dieser Bemühungen ist eine direkte Übertragbarkeit der im Tiermodell ermittelten Ergebnisse auf den Menschen und damit eine Vorhersage der Immunogenität einer HIV/AIDS-Vakzine nicht möglich.

Bei der Entwicklung einer effektiven DNA-Vakzine sollte zunächst generell überprüft werden, ob die Genexpression in heterologen Systemen gewährleistet ist und die Eigenschaften der Genprodukte vergleichbar sind. Somit können bereits im Ansatz Mißverständnisse oder Artefakte bei der Übertragung der Ergebnisse auf unterschiedliche Tiermodelle vermieden werden. Dies ist insbesondere dann von großer Bedeutung, wenn, wie bei HIV, das entsprechende Tiermodell nicht permissiv für das entsprechende Pathogen ist und kein geeignetes Impfvirus zur Verfügung steht.

D.1.1 Genexpression HI-viraler Strukturproteine in Nagetierzellen

Die zeitliche Expression HI-viraler Proteine wird durch einen komplexen, posttranskriptionellen Prozeß reguliert (vgl. A.2). Es gilt als unumstritten, daß die Retention ungespleißter bzw. partiell gespleißter pre-mRNA Transkripte, welche die viralen Strukturproteine Gag, Gagpol und Env kodieren, initial durch die sequenzspezifische Bindung des viralen Ko-Faktors Rev an die allen dieser RNA-Spezies gemeinsame RNA-Sekundärstruktur, RRE, sowie des weiteren durch die Interaktion mit zellulären Exportfaktoren, wie z.B. CRM1, und infolgedessen durch effektiven Kern-Export überwunden wird (zur Übersicht: Cullen, 1998; Hope, 1999; Pollard und Malim, 1998). In vorausgegangenen Arbeiten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die in eukaryontische Expressionsvektoren inserierte Genkassette des gruppenspezifischen Antigens Gag (**wtgag**) allein keine Expression des 55kDa-Polypeptids gewährleistet. In diesem Zusammenhang wurde anhand unterschiedlicher Reporterkonstrukte zur Untersuchung der Rev-abhängigen HIV-1 Genexpression, demonstriert, daß die Gag-spezifische Wildtyp pre-mRNA vermutlich aufgrund spezifischer, jedoch bislang unzureichend charakterisierter RNA-Sequenzelemente (INS), nukleär degradiert wird. Eine Stabilisierung der RNA sowie ein effizienter RNA-Export als Voraussetzung für eine hohe Expressionsrate HI-viraler Strukturproteine konnten ferner durch virale, cis-ständige Sequenzelemente innerhalb der 5',- und 3'-nicht translatierte Bereiche, 5'-UTR (Lenz *et al.*, 1997) und 3'-RRE, sowie durch die Ko-Expression des viralen Proteins Rev erzielt werden (**UTR-wtgag-RRE**). Zudem konnte gezeigt werden, daß der im 5'-UTR enthaltene Hauptspleißdonor (5'-SD) essentiell für den Rev/RRE-abhängigen Export der Wildtyp pre-mRNA ist (Tange *et al.*, 1996, Graf *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen wurden vorwiegend an humanen Zellen (z.B. H1299, 293T, HeLa) sowie der nicht-humanen Primatenzelllinie COS-7 durchgeführt, welche aus dem natürlichen Wirt des HI-Virus bzw. des SI-Virus stammen und damit die für eine effiziente virale Replikation nötigen Faktoren bereitstellen. Hierbei konnten keine Zelltyp-spezifischen Unterschieden in der Rev/RRE-abhängigen Expression detektiert werden. (Graf *et al.*, 2000).

D.1.1.1 Inhibition der Rev/RRE-abhängigen Gag Expression in Nagetierzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß, die untersuchten Nagetierzellen, im Gegensatz zu Primatenzellen, eine Rev/RRE-abhängige Expression des viralen Strukturproteins Pr55^{gag} nicht begünstigen. Diese in murinen Zellen und Hamsterzellen beobachtete Limitation des Rev/RRE-vermittelten Expressionssystems Gag-spezifischer INS-haltiger Wildtyp pre-mRNAs läßt vermuten, daß in Nagetierzellen entweder ein oder mehrere essentielle Faktoren fehlen oder aber nicht funktionell sind. Bereits vor über zehn Jahren wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, daß die Funktion von Rev in murine Zelllinien, wie z.B. NIH/3T3, aufgrund des Fehlens eines essentiellen trans-aktiven Faktors, blockiert sein könnte (Trono und Baltimore 1990). Eine eindeutige Widerlegung dieser Hypothese mit Hilfe Rev/RRE-abhängiger CAT-Reporterkonstrukte (Hope *et al.*, 1990) gelang allerdings nicht (Malim *et al.*, 1991). Dagegen konnte übereinstimmend beobachtet werden, daß die Expressionssteigerung in Anwesenheit von Rev in den murinen Zelllinien weitaus geringer war, wie in den humanen Zellen (Vaishnav *et al.*, 1991, Winslow und Trono, 1993, Shukla *et al.*, 1996). Es ist bekannt, daß für die nukleäre Instabilität der viralen Wildtyp Gag pre-mRNA in Abwesenheit des 5'-UTR bzw. 3'-RRE Elementes hauptsächlich das cis-aktive, sequenzspezifische 217nt umfassende AU-reiche Element, INS-1^{p17} (84-301nt), verantwortlich ist (Schwartz *et al.*, 1992), obwohl auch mehrere destabilisierende Motive innerhalb der für das Kapsidprotein kodierenden Region (INS-2; 551-1031nt) identifiziert

wurden (Schneider *et al.*, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, daß ineffiziente Spleißvorgänge einer durch INS-Elemente vermittelten nukleären Degradation entgegenwirken können (Mickaelian *et al.*, 1996). Da die UTRwtgagRRE pre-mRNA sowohl einen effizienten 5'-Hauptspleißdonor (95%) als auch innerhalb der 3'-RRE Region mehrere suboptimale Spleißakzeptoren (41%) (O'Reilly *et al.*, 1995) besitzt, könnte demzufolge die INS-haltige RNA aufgrund ineffizienter Spleißvorgänge nukleär stabilisiert werden. Die dadurch bedingte Akkumulation der Gag-spezifischen, ca. 3.000nt umfassenden UTRwtgagRRE RNA-Transkripte im Zellkern konnte zwar in den humanen Zelllinien H1299 und 293T, sowie der Hamsterzelllinie CHO, nicht aber in den murinen Zelllinien nachgewiesen werden. Entweder wurde die RNA in den murinen Zellen unabhängig von der Existenz suboptimaler Spleißvorgänge nukleär degradiert oder aber, die HI-viralen Spleißstellen werden weit effizienter genutzt als in den humanen Zelllinien, so daß infolgedessen die 3000nt umfassenden pre-mRNAs bereits in niedermolekulare Moleküle gespleißt wurde, die durch die in den Versuchen verwendeten Sonden nicht detektierbar waren. Letztere Vermutung deckt sich mit der Beobachtung, daß in murinen Zellen der Anteil gespleißter proviraler RNA im Verhältnis zu ungespleißter RNA auch in Anwesenheit von Rev, welcher in humanen Zellen an der Inhibition von Spleißvorgängen zumindest beteiligt ist (Konforti *et al.*, 1993; Kjems und Sharp 1993; Kjems *et al.*, 1996), um das 10-40fache höher war als in den humanen Zellen, so daß nur eine verschwindend geringe Menge ungespleißter, für die Strukturproteine kodierender, RNA-Transkripte detektiert wurde (Malim *et al.* 1991; Winslow und Trono, 1993; Trono und Baltimore 1990; Bieniasz und Cullen 2000). Während weiterhin in den humanen Zellen in Anwesenheit von Rev ein effizienter Export der Gag-spezifischen UTRwtgagRRE RNA in das Zytoplasma beobachtet wurde, wurden in der Hamsterzelle CHO nur geringe Mengen zytoplasmatischer RNA-Transkripte nachgewiesen. In den murinen Zelllinien dagegen wurden unabhängig von der Anwesenheit des viralen Exportfaktors Rev in trans geringe Mengen Gag-spezifischer 3.000nt umfassender UTRwtgagRRE Transkripte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert. Dennoch konnte in Anwesenheit von Rev sowohl in den stabilen CHOREVgfp Zellen als auch in murinen 3T3REVgfp Zellen eine geringfügig erhöhte nukleäre Stabilität der UTRwtgagRRE detektiert werden. Obwohl eine zellspezifische Dislokalisierung des viralen Rev-Proteins sowohl in der vorliegenden Arbeit, wie auch von anderen Arbeitsgruppen ausgeschlossen werden konnte (Shukla *et al.*, 1996), hat es den Anschein, daß neben der erhöhten nukleären Instabilität auch effizientere Spleißvorgänge den Rev/RRE-vermittelten RNA-Export indirekt in den murinen und direkt in der CHO Zelllinie blockieren. In diesem Zusammenhang wurde das Fehlen charakteristischer, nukleärer RRE-Ribonukleoprotein(RNP)-Komplexe in der murinen Zelllinie A9 beschrieben (Shukla *et al.*, 1994), wobei möglicherweise die Assoziation des Exportkomplexes inhibiert sein könnte. Zusammenfassend könnten in den murinen Zelllinien (i) in Abwesenheit von Rev die INS-haltige pre-mRNA trotz suboptimaler Spleißstellen effizient gespleißt oder aber degradiert werden und (ii) in Anwesenheit von Rev die Spleißvorgänge nur bedingt inhibiert werden, so daß infolgedessen der durch RRE/Rev-vermittelte Effekt reduziert und die Gag Expression verhältnismäßig niedrig ist. Im Zusammenhang mit der Veröffentlichung von an das RRE-Element bindenden oder die RNA-stabilisierenden hnRNP A/B Proteinen („heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“), welche für die Inhibition HI-viraler Spleißprozesse bzw. den RNA-Export essentiell sind (Caputi *et al.*, 1999), sowie von dem ebenfalls an RRE-bindende Rev-Homolog humaner Zellen, Sam68 („Src-associated protein in mitosis“; Bindungsmotif: -UAAA-), welches die Funktion von Rev synergistisch beeinflusst und partiell ersetzen kann (Reddy *et al.*, 1999; Soros *et al.*, 2001), wäre es denkbar, daß ein oder mehrere dieser RNA-bindenden Faktoren bei den beobachteten negativen Effekten in den Nagetierzellen eine Rolle spielen könnten. Ebenfalls in Frage kommen könnten Faktoren, die mit dem Rev/RRE-vermittelten RNA-Export in direktem oder indirektem Zusammenhang stehen, wie z.B. CRM1

(Fornerod *et al.*, 1997), eIF-5A (Ruhl *et al.*, 1993), hRIP/Rab (Fritz *et al.*, 1995; Bogerd *et al.*, 1995) oder bislang nicht identifizierte Faktoren. Da diese inhibitorischen Effekte in Heterokaryonten aus murinen und humanen Zellen (Mariani *et al.*, 2001) sowie durch bislang unbekannte Genprodukte der humanen Chromosomen 6 und 11 (Shukla *et al.*, 1996) komplimentiert werden können, läßt vermuten, daß in den Nagetierzellen zellspezifische, trans-aktive Faktoren fehlen. Dabei könnte es sich möglicherweise um „Shuttle“-Proteine oder um Faktoren handeln, die aktiv in den Zellkern transportiert werden können.

D.1.1.2 Inhibition der CTE-abhängigen Gag Expression in Nagetierzellen

Da in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, daß die Rev/RRE-abhängige Gag Expression in Nagetierzellen deutlich reduziert ist, wurden zudem alternative Expressionssysteme auf ihre Effektivität hin getestet. Das CTE-Element („*constitutive transport element*“) des retroviralen Typ-D Mason-Pfizer Affenvirus (MPMV) und des SRV-1/2 („*simian retrovirus 1 and 2*“) ist im 3'-UTR Bereich lokalisiert und stellt ein konstitutives, cis-aktives RNA-Exportelement dar, welches in Analogie zu Rev/RRE für den Export ungespleißter RNA aus dem Zellkern verantwortlich ist (Bray, *et al.* 1994; Ernst *et al.*, 1997; Tabernero *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum Rev/RRE-vermittelten Export (LMB-sensitiv) wird dieser Mechanismus nicht durch den zellulären Exportfaktor CRM1, sondern durch den Exportfaktor zellulärer mRNAs, Tap/Mex67, vermittelt (nicht LMB-sensitiv) (Grüter *et al.* 1998; Pasquinelli *et al.* 1997; Kang *et al.* 2000; Braun *et al.* 1999). Zudem wurden weitere, mögliche am CTE-vermittelten Export beteiligte Proteine, wie z.B. NXT1, RHA (RNA Helikase A) und HAP95, beschrieben (Guzik *et al.*, 2001; Tang *et al.* 1997; Yang *et al.* 2001; Westberg *et al.* 2000). Ferner scheint die Effektivität des CTE-Elements positionsabhängig zu sein und in einem direkten Zusammenhang zur Entfernung des Poly(A)-Schwanzes zu stehen (~ 200nt), so daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem CTE-Element und Faktoren, die an der Polyadenylierung beteiligt sind, nicht ausgeschlossen werden kann (Rizvi. *et al.*, 1996 und 1997). In vorausgegangenen Arbeiten konnte in humanen Zellen gezeigt werden, daß auch die nukleäre Stabilität INS-haltiger RNA-Transkripte und somit die Effektivität des CTE-vermittelten Exports HI-viraler, INS-haltiger Gag pre-mRNA Transkripte von dem Vorhandensein des 5'-UTR Bereichs und insbesondere dem in dieser Region lokalisierten 5'-Hauptspleißdonor abhängt (M.Graf, Dissertation IMMh, Regensburg 2000). Allerdings ist das CTE-Exportsignal auch ohne 5'-UTR in Primatenzellen funktionell, wenn die INS-Sequenzen gezielt mutiert sind (Qiu *et al.*, 1999). Demnach scheint der 5'-UTR/SD1 Bereich und die infolge ineffizienter Spleißvorgänge bedingte nukleäre Stabilität der INS-haltigen wtgag RNA, erst die Voraussetzung für einen effizienten RNA-Export zu sein. In voneinander unabhängigen Versuchen konnten geringen Mengen der 2.500nt umfassenden, UTRwtgagCTE spezifischen RNA-Transkripte im Zellkern und Zytoplasma der murinen Zellen nachgewiesen werden. Da das CTE-Element im Gegensatz zum RRE-Element allerdings keinen bekannten Spleißakzeptor besitzt, wäre es vorstellbar, daß hierbei die RNA stabilisiert, jedoch nicht gespleißt werden kann. Trotz dieser teilweise geringfügigen nukleären Stabilisierung in den murinen Zellen, wurde kein effizienter und aktiver Export der RNA in das Zytoplasma beobachtet. Auch in der Hamsterzelllinie CHO konnte trotz nukleärer Akkumulation der UTRwtgagCTE RNA-Transkripte im Zellkern kein Export nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen implizieren, daß in den Nagetierzellen Faktoren fehlen, die sowohl für den CTE-vermittelten Export, als auch für den Rev/RRE-vermittelten Export INS-haltiger RNA-Transkripte benötigt werden.

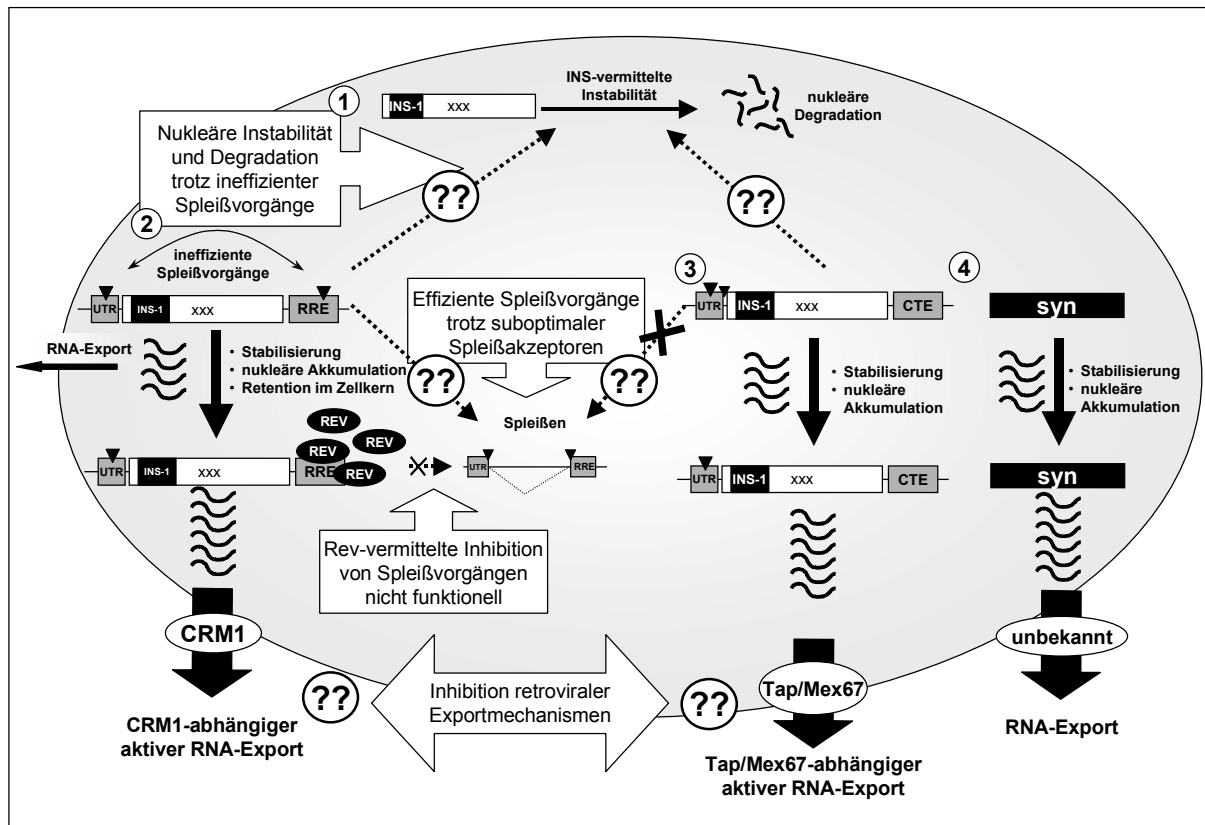


Abbildung D-1 Modell der verschiedenen Systeme und Mechanismen der Gag Expression in humanen und nicht-humanen Primatenzellen, sowie deren mögliche Blockierung in Nagetierzellen. (1) INS-vermittelte Degradation INS-haltiger Gag-spezifischer wt-RNA Transkripte im Zellkern (2) Rev/RRE abhängige Expression INS-haltiger wtgag RNA Transkripte: aufgrund der im 5'-UTR vorhandenen Spleißdonorstelle und der im 3'-RRE gelegenen suboptimalen Spleißakzeptoren kommt es aufgrund ineffizienter Spleißvorgänge zu einer nukleären Stabilisierung. Die nukleäre Retention kann im folgenden nur durch Ko-Expression des viralen Faktors Rev aufgehoben werden, welches an RRE bindet und den CRM1-abhängigen RNA-Export initiiert (3) CTE-abhängige Expression INS-haltiger wtgag RNA Transkripte: aufgrund der im 5'-UTR vorhandenen Spleißdonorstelle, wird die RNA stabilisiert und Rev-unabhängig mittels des an das CTE-Element bindenden zellulären Faktors Tap/Mex69 den Export vermittelt. (4) Von viralen Faktoren unabhängige Expression nicht-INS haltiger Gag-spezifischer, synthetischer RNA-Transkripte über einen bislang unbekannten Exportmechanismus. Die möglichen Ursachen der in den Nagetierzellen beobachteten, reduzierten Gag Expression INS-haltiger Rev-abhängiger (UTRwtgagRRE) und Rev-unabhängiger (UTRwtgagCTE) RNA-Transkripte sind an entsprechender Stelle markiert.

D.1.1.3 Konstitutive Gag Expression des Kodon-optimierten Gens

Im Zusammenhang mit der Identifizierung und Charakterisierung der die HI-virale RNA destabilisierenden INS Sequenzen innerhalb der für p17^{MA}, - und p24^{KA}-kodierenden Region (Schwartz S et al., 1992; Schneider R. et al., 1997), sowie innerhalb des pol und env Leserahmens (Maldarelli F., et al. 1991; Cochrane A.W. et al., 1991; Nasioulas G. et al., 1994; Brighty D. und Rosenberg M. 1994) konnte gezeigt werden, daß späte HI-virale Strukturproteine Gag bzw. Gagpol durch selektive Mutationen der INS-Sequenzen entsprechender Genkassetten Rev/RRE-unabhängig exprimiert werden können (Schwartz S. et al. 1992; Schneider R. et al 1997; Qiu J. et al., 1999). Des weiteren wurde in unserer Arbeitsgruppe zur vollständigen Elimination destabilisierender, HI-viraler Sequenzen ein auf das Kodon von hochexprimierten Säugetiergenen angepaßtes synthetisches Gen (syngag) hergestellt, welches für das 55kDa Polyprotein kodiert. Wie bereits in früheren Arbeiten und auch in mit Hilfe der in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnissen gezeigt werden konnte, ist die transkribierte, synthetische pre-mRNA äußerst stabil und wird sowohl unabhängig von cis,- und trans-aktiven viralen (z.B. Rev/RRE und CTE) und zellspezifischer Faktoren effizient aus dem Zellkern exportiert. Der Exportmechanismus der syngag RNA Transkripte wird dabei nicht durch CRM1 vermittelt (Graf M., et al. 2000). Während sich in

humanen Zellen die dadurch erzielte Expressionsrate nur geringfügig von derjenigen unterscheidet, die mit der Verwendung des Rev/RRE Systems erzielt wird, wurde dem gegenüber die Gag Expressionsrate in den untersuchten Nagetierzellen um nahezu das 5-10fache gesteigert. Auch andere Arbeitsgruppen konnten durch Adaption des Kodongebrauchs an das von hochexprimierten Säugetiergenen eine effiziente, Rev/RRE-unabhängige Expression der HI-viralen Strukturproteine Gag, Gagpol und Env erzielen (Haas J., 1996; Megede J. et al., 2000; Kotsopuluou E. et al., 2000; Huang Y. et al., 2001). Der Vorteil dieses Zelltyp-unabhängigen Expressionssystems gegenüber dem Rev/RRE-bzw. dem CTE-System ist nicht nur, daß auf die extrem ineffiziente Ko-Transfektion und Ko-Expression eines regulatorischen, viralen Proteins *in vivo* verzichtet werden kann, sondern auch, daß das gag Gen aufgrund der Kodon-Optimierung keine HI-viraler Wildtyp Sequenzen mehr beinhaltet, welche z.B. im 5'-UTR Bereich spezifische Verpackungssignale viraler RNA trägt. Dadurch wird zudem die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit dem HI-viralem Wildtyp-Genom reduziert. Aus diesen genannten Gründen der Sicherheit und der praktischer Relevanz scheint das synthetische Gen ein optimaler Kandidat einer HIV-1 spezifischen DNA-Vakzine, insbesondere zur Evaluierung dessen Immunogenität im Balb/c-Mausmodell zu sein. Die Genexpression eines partiell synthetischen gag Gens, dessen INS-Sequenzen durch singuläre Mutationen gezielt zerstört wurden, kann in Primatenzellen durch das CTE-Exportelement von SRV-1 zusätzlich gesteigert werden (Qiu et al. 1999). Auch mit Hilfe anderer, viraler RNA-Exportsignale, wie z.B. dem PRE-Element des Hepatitis B Virus, konnte wiederholt eine Erhöhung der Expressionsrate insbesondere von Genen, welche keine Introns besitzen, nachgewiesen werden (Huang und Carmichael, 1997; Huang et al. 1999; Farjot et al. 2000; Sandri-Goldin, et al. 1998; Huang und Yen 1995; Paca et al., 2000). Die Identifizierung geeigneter ubiquitärer Exportsignale und die damit erweiterten syngag Expressionsvektoren könnten die synthetischen DNA-Vakzine Kandidaten möglicherweise noch zusätzlich optimieren.

D.1.2 Partikelfreisetzung und Prozessierung der Strukturproteine Gag und Gagpol in Nagetierzellen

D.1.2.1 Effiziente Abschnürung und Freisetzung Virus-ähnlicher Gag-Partikel in verschiedenen Zellkultursystemen

Wie bereits erwähnt, sollte für eine hohe Wirksamkeit und Immunogenität eines potentiellen DNA-Vakzine Kandidaten nicht nur die Gag Genexpression in heterologen Systemen an sich, sondern auch die Eigenschaft der Freisetzung partikulärer Virus-ähnlicher Partikel in den Überstand, gewährleistet sein. In Kapitel A.2 wurde bereits detailliert über die Funktion der viralen Strukturproteine Gag und Gagpol bei der Ausbildung und Reifung infektiöser HI-Virionen berichtet. Daneben ist, auch in Abwesenheit anderer, viraler Faktoren, Gag bzw. Gagpol in der Lage Virus-ähnliche Partikel (VLPs) von der zellulären Oberfläche von Primatenzellen und Insektenzellen abzuschnüren und in den Überstand freizusetzen (Smith et al., 1990; Mergener et al., 1992; Wagner R. et al., 1992 und 1994; Wills und Craven, 1991). Diese Eigenschaften wurden ebenfalls in verschiedenen Nagetierzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Pr55^{gag}-Partikel grundsätzlich in allen untersuchten Nagetierzellen gewährleistet ist. Die von unterschiedlichen Zelllinien freigesetzten Partikel hatten übereinstimmend eine Dichte von 1,16g/cm³ (Mergener, 1991; Wagner et al., 1994). Während die Partikelfreisetzung in der Primatenzelllinie COS-7 und der Hamsterzelllinie CHO signifikant,

und in den murinen Zellen um 50% gegenüber den humanen Zellen reduziert war, konnte kein wesentlicher Unterschied zu der Hamsterzelllinie BHK beobachtet werden. Daraus geht hervor, daß die zelltypspezifischen Unterschiede in der Partikelfreisetzung nicht ausschließlich auf Nagetierzellen bezogen werden können.

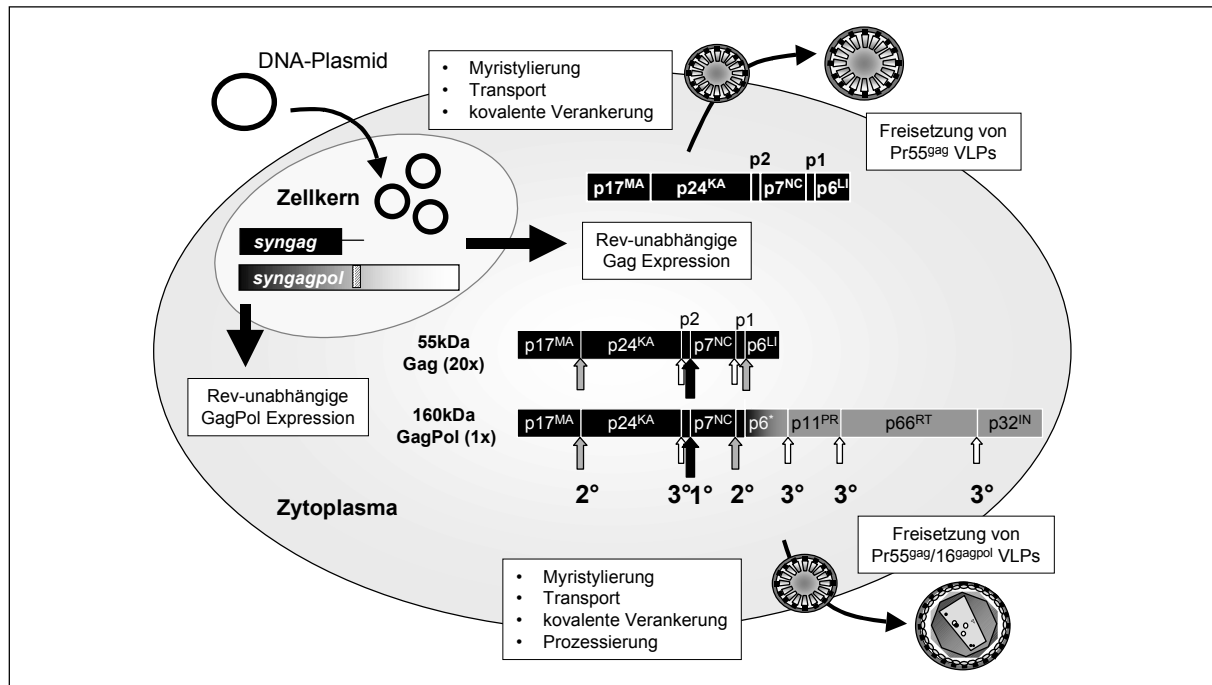


Abbildung D-2 Schematische Darstellung der Rev-unabhängigen Gag bzw GagPol (20:1) Expression, sowie der Freisetzung Pr55^{Gag} Virus-ähnlicher Partikel bzw. die Freisetzung und Prozessierung der Gag-GagPol Partikel in Anwesenheit der viralen Protease: die primäre proteolytische Spaltung (1°) erfolgt zwischen p2 und Nukleokapsid und generiert bereits noch vor der Partikelabschnürung die Spaltprodukte p41 (MA-KA-p2), p14 (NC-p1-LI) und p110 (NC-p6*-PR-RT-IN). Zumeist erst während der Partikelreifung werden die Polyproteine an ihren sekundären Spaltstellen (2°), in die Produkte p17^{MA}, p26 (KA-p2), p8 (NC-p1), p6^{LI}, p7^{NC}, p100 (p6*-PR-RT-IN) gespalten. Die tertiären Spaltungen (3°) erfolgen im Partikel ca. 400x langsamer wie die primäre Spaltung und generieren die prozessierten Gag und Pol Proteine.

D.1.2.2 Effiziente Prozessierung freigesetzter Pr55^{gag}/Pr160^{gagpol} Virus-ähnlicher Partikel in verschiedenen Zellkultursystemen

In der vorliegenden Arbeit konnte neben der Ausbildung und Freisetzung Pr55^{gag}-VLPs ebenso die Freisetzung von Pr55^{gag}/Pr160^{gagpol} Partikel aus allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Zudem wurde mit Hilfe eines Reportersystems gezeigt, daß der HI-virale – 1 ribosomale Leserastersprung des Gag-Pol Überganges (vgl. A.2), welcher für das korrekte Verhältnis von Gag zu GagPol Proteinen (Gag:GagPol=20:1) verantwortlich ist (Jacks *et al.* 1985 und 1988, Shehu-Xhilaga *et al.* 2001), sich in allen Zellen mit einer im proviralen Kontext identischer Häufigkeit von 4-6% ereignet. Der retrovirale ribosomale Leserastersprung scheint somit unabhängig von viralen oder zell,- und gewebsspezifischen Faktoren zu sein (Moosmayer *et al.* 1991; Jacks *et al.* 1988; Wilson *et al.* 1988). Obwohl bereits 1991 für die murine Zelllinie Ltk- und die Hamsterzelllinie BHK ein möglicher Prozessierungsdefekt diskutiert wurde (Moosmayer *et al.* 1991), konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig sowohl eine initiale, intrazelluläre Prozessierung, als auch eine nach Abschnürung der Virus-ähnlichen Partikeln vollständige Prozessierung der Vorläuferproteine durch die virale Protease (Smith *et al.*, 1990, Kaplan *et al.*, 1994; Hendersson *et al.*, 1992, Pettit *et al.*, 1994 und 1998, Wiegers *et al.*, 1998; Oroszlan und Luftig 1990) in allen Zelllinien und mit gleicher Effizienz nachgewiesen werden. Somit kann auch

eine Inhibition der proteolytischer Prozessierung der HI-viralen Strukturproteine Pr55^{gag} und Pr160^{gagpol} in Nagetierzellen ausgeschlossen werden.

D.1.3 Inhibition der HI-viraler Replikation in Nagetierzellen

Der Zelltropismus verschiedenster Viren wird i.d.R. über die zell,- und speziesspezifischen Faktoren der Wirtszelle definiert. Im Falle des humanpathogenen HI-Virus ist die Infektion einer Zelle abhängig von der Anwesenheit des viralen Rezeptors CD4 und der Ko-Rezeptoren CXCR4 und/oder CCR5 (Maddon *et al.*, 1986; zur Übersicht: Moore *et al.*, 1997; Kinter *et al.*, 2000). Weiterhin können Differenzierungsstatus und Aktivierungsgrad der Lymphozyten einen Einfluß auf weitere Schritte der viralen Replikation nehmen (Stevensson *et al.*, 1990; Zack *et al.*, 1990). Zudem sind Transkription, nukleo-zytoplasmatischer Transport viraler RNAs, Translation und Prozesse des Virus-Assemblys von zellulären Faktoren abhängig. *In vitro* können ausschließlich humane und nicht-humane Primatenzellen, welche CD4 und CXCR4 bzw. CCR5 exprimieren mit HIV-1 infiziert werden. Auch mit VSV-G („vesicular stomatitis virus G glycoprotein“) pseudotypisierte HI-Viren, deren Zelltropismus unabhängig von den Rezeptormolekülen ist, sind zwar in der Lage in einer Vielzahl verschiedener Säugetierzellen, jedoch nicht in Zellen, die Hamstern, Mäusen und Kaninchen, sowie Rindern und Schweinen entstammen, zu replizieren (Hofmann W. *et al.* 1999). Die Ursache der in Nagetierzellen beobachteten Inhibition HI-viraler Replikation, ist das Unvermögen des murinen, nukleären Faktors CyclinT₁, welcher bereits als vom humanen Chromosom 12 kodierter Ko-Faktor der Tat-vermittelten viralen Transkriptionsinitiation und Elongation identifiziert wurde (vgl. A.2), effizient mit Tat/TAR zu interagieren (Bieniasz *et al.*, 1998; Fujinaga *et al.*, 1999; Garber *et al.*, 1998; Kwak *et al.*, 1999). Interessanterweise unterscheidet sich das murine Protein von dem humanen CyclinT₁ nur in einem einzigen Aminosäurerest (Tyr₂₆₁/Cys₂₆₁). Die Fülle an neuen Erkenntnissen über die möglichen Ursachen einer Inhibition der HIV-1 Replikation in murinen Zellen, initiierte des weiteren das Bestreben ein effizientes und billiges Nagermodell zur Studie der viralen Pathogenese, Immunmodulation sowie zur Austestung potentieller HIV-1 Vakzine Kandidaten und Therapeutika zu entwickeln (Browning *et al.*, 1997; Sawada *et al.* 1998; Speck *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2001, zur Übersicht: Jamieson und Zack 1999). In transgenen Kaninchen und Ratten (Langley *et al.*, 1998; Reid *et al.* 2001) wurde nach Infektion lediglich eine schwache Replikation beobachtet. Allerdings konnte, im Gegensatz zu aus Kaninchen-stammenden Zellen (Speck *et al.*, 1998), bislang keine murine Zelllinie entwickelt werden, die trotz stabiler Expression von hu-CD4, hu-CXCR4 und/oder hu-CCR5 sowie hu-CycT₁ permissiv für HIV-1 war. Auch nach Infektion muriner, hu-CycT1 positiver Zellen mit pseudotypisierten HI-Viren konnte keine Freisetzung infektiöser HI-Viren nachgewiesen werden (Garber, *et al.* 1998; Mariani *et al.*, 2000). Da in beiden Fällen sowohl die Infektion der Zellen, die Integration des viralen Genoms in die Wirtszelle und die virale Transkription nachgewiesen wurde, muß die Inhibition auf post-transkriptioneller Ebene zu finden sein. Tatsächlich, wurde in verschiedenen murinen Zelllinien und Hamsterzellen eine Verschiebung der Verhältnisse von ungespleißter zu gespleißter Gesamt-RNA (Faktor 6-40), eine infolgedessen reduzierte Expression der viralen Vorläuferproteine Pr55^{gag} und Pr55^{gagpol}, und auch eine verminderte intrazelluläre Konzentration, des proteolytisch abgespaltenen p41-Intermediats (p17-p24-p2) und des 24kDa-Kapsidproteins beobachtet. Demzufolge wurden nur geringe Mengen freigesetzter Partikel, die allerdings eine dem Wildtyp-entsprechende Morphologie aufwiesen und infektiös waren, im Zellkulturüberstand detektiert (Mariani *et al.*, 2000, Bieniasz und Cullen, 2000). Aufgrund des in diesem Zusammenhang beobachteten elektronendichten, multizentrisch angeordneten Gag-spezifischen Materials („lamellare Lysosomen“), wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Inhibition HI-viraler Replikation auf einem Assembly-Defekt, gestützt auf

einem fehlgeleiteten Transport der viralen Strukturproteine in zelluläre Vesikel, beruht (Mariani et al., 2000). Im Zusammenhang mit den erörterten und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen scheint es allerdings unwahrscheinlich, daß die Inhibition der HI-viralen Replikation in Nagetieren allein auf einen Assembly-Defekt zurückzuführen ist. Aufgrund der Tatsache, daß sich bei Verwendung Rev/RRE-unabhängiger Expressionssysteme weder der RNA-Export, die Protein Expression, die Ausbildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Pr55^{gag} und Pr55^{gag}/Pr160^{gagpol}-Partikel, noch die Prozessierung der Vorläuferproteine in den untersuchten Nagetierzellen von den Prozessen in humanen Zellen signifikant unterscheidet, müssen andere posttranskriptionelle Faktoren (vgl. Abb. D-1) eine primäre Rolle spielen. In Folge von reduzierten RNA-Stabilitäten, veränderten Spleißvorgängen und Spleißprodukten sowie unzureichenden RNA-Export könnte die reduzierte Gag bzw. GagPol Expression und/oder die Expression partiell verkürzter viraler Strukturproteine die Prozessierung und Reifung der Partikel erheblich stören. Der Befund, das die mit HIV infizierten, murinen Zellen (hu-CD4⁺, hu-CCR5⁺, hu-CycT1⁺) nach Fusion mit nicht-infizierten, humanen 293T Zellen (Heterokaryon) bereits nach 24h eine deutliche Erhöhung intrazellulärer Mengen viraler Strukturproteine und freigesetzter infektiöser Partikel aufwiesen, wurde zwar ebenfalls als Bestätigung eines in murinen Zellen fehlerhaften Virus-Assemblys angesehen (Mariani et al., 2001), doch könnte dies ebenso gut auf „Shuttle“-Proteine hindeuten, die aus dem humanen in den murinen Zellkern gelangen, um so die Blockierung nukleärer, posttranskriptioneller Prozesse in murinen Zellen aufzuheben.

D.1.4 Die Expressionsrate von Gag korreliert mit der Immunogenität der DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell

Obwohl die retroviralen Exportmechanismen Rev/RRE und CTE in humanen Zellen die Expression des viralen Strukturproteins Pr55^{gag} gewährleisten, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß selbige Mechanismen, insbesondere in murinen Zelllinien nicht bzw. nur bedingt funktionsfähig sind. Durch die Anpassung des viralen AU-reichen Kodongebrauchs an den von hochexprimierten Säugetiergenen und die dadurch bedingte Elimination der INS-Elemente konnte eine von zell,- und gewebsspezifischen Faktoren unabhängige Gag Expression ermöglicht werden. Ferner konnte gezeigt werden, daß die exprimierten Pr55^{gag} Proteine auch in murinen Zellen in Form von Virus-ähnlichen Partikeln freigesetzt werden. Diese zuvor in Zellkultur erzielten Ergebnisse korrelierten mit der induzierten Immunantwort *in vivo* nach intramuskulärer Immunisierung der Balb/c-Mäuse mit den entsprechenden Expressionskonstrukten. Hierbei konnte gezeigt werden, daß insbesondere bei einer geringen Dosis der verabreichten Plasmid-DNA (20µg) allein das synthetische, Kodon-optimierte Konstrukt eine effiziente humorale Immunantwort induzierte. Im Gegensatz dazu waren diejenigen Konstrukte, deren Pr55^{gag} Expression von der Funktionsweise des Rev/RRE und CTE-vermittelten Mechanismen abhängt gleichermaßen ineffizient. Dies zeigt nicht nur, daß die *in vitro* ermittelten Expressionsraten direkt mit der Immunogenität *in vivo* korreliert, sondern verdeutlicht auch, daß grundlegende Expressionsanalysen *in vitro* wesentlich zum Verständnis der Wirkungsmechanismen insbesondere einer DNA-Vakzine beitragen können.

D.2 Immunogenität des Kodon-optimierten Gag-spezifischen DNA-Vakzine Kandidaten pc-syngag

D.2.1 Die Bedeutung des Gag Proteins für eine HIV/AIDS-Vakzine

Es ist unumstritten, daß eine erfolgversprechende HIV/AIDS Vakzine nicht nur Virusisolat-übergreifende, neutralisierende Antikörper, sondern auch reaktive CD4⁺ T_H-Lymphozyten sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen induzieren sollte (vgl. A.4). Während eine Immunisierung mit aufgereinigten, rekombinanten HI-viralen Hüllproteinen oder mit entsprechenden DNA-Vakzine Kandidaten vornehmlich auf die Induktion der humoralen Immunantwort abzielt, sollte dagegen eine Vakzine gegen die Strukturproteine und Regulatorproteine vornehmlich die zelluläre Immunantwort stimulieren. Eine Vielzahl immunogener HIV-spezifischer Epitope wurde bislang innerhalb der Strukturproteine Env, Gag und Pol, als auch der regulatorischen und akzessorische Proteine Tat, Rev, Nef und Vpr identifiziert (<http://hiv-web.lanl.gov/immunology>). Aufgrund der hohen Sequenzvariabilität unterschiedlicher Virusisolate, wäre jedoch insbesondere die Induktion umfassender, zellulärer Immunantworten gegen konservierte Bereiche HI-viraler Proteine vorteilhaft. Insbesondere das HI-virale Strukturprotein Gag beinhaltet eine Vielzahl immunogener und Virus-Isolat übergreifender, hoch-konservativer Epitope. Obwohl die Rolle von Antikörpern gegen das Gag Protein bzw. dessen Spaltprodukte, welche sich innerhalb des membranumhüllten Viruspartikels befinden, hinsichtlich der Virus-Elimination umstritten sein mag (Cheingsong Popov *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 1986; Forster *et al.*, 1987; Papsidero *et al.*, 1989; McRae *et al.*, 1991), enthält das Gag Protein eine Vielzahl konservierter, T-Helfer,- und ZTL Epitope, für die eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation *in vivo* beschrieben wurde (Nixon *et al.*, 1988; Koup *et al.*, 1991; Buseyne *et al.*, 1993; Harrer *et al.*, 1996 und 1998; Betts *et al.*, 1999; Durali *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1998; Klein 1995; Wagner *et al.*, 1999). In Kapitel A.5 wurde bereits die DNA-Immunisierung, welche in prä-klinischen Studien eine schützende Immunantwort gegen eine Vielzahl von infektiösen Erregern induzieren konnte (zur Übersicht: Donnelly und Ulmer, 1997), als eine neuartige Impfstoffstrategie einer kombinatorischen HIV/AIDS-Vakzine vorgestellt, und deren Wirksamkeit und die Mechanismen der Immuninduktion detailliert diskutiert. Im murinem Tiermodell induzierten bislang untersuchte DNA-Vakzine Kandidaten im allgemeinen effiziente zelluläre Immunantworten, obwohl die induzierten Antikörpertiter i.d.R. immer niedriger waren als eine entsprechende Protein-Vakzinierung in Anwesenheit immunstimulatorischen Adjuvantien (Ulmer *et al.*, 1993). Auch gegen HIV-1 wurde eine Vielzahl auf DNA basierender Impfstoffe (zur Übersicht: Barouch und Letvin, 2000; Schultz *et al.*, 2000) entwickelt, obwohl bislang keiner dieser *env* bzw. *gag/pol* Vakzine Kandidaten eine, eindeutig vor Infektion mit einem hoch-pathogenem Virus schützende Immunantwort im Tiermodell induzierte.

Die Limitation einer effizienten gegen HI-viraler Strukturproteine, wie z.B. Gag, GagPol und Env gerichteten DNA-Vakzine beruhte stets auf der bereits ausführlich diskutierten Rev/RRE-Abhängigkeit der Genexpression. Doch auch die Ko-Immunisierung eines Rev-exprimierenden Vektors ist aufgrund der geringen Transfektionseffizienz *in vivo* und der regulatorischen Eigenschaften des Proteins selbst, nicht für die DNA-Immunisierung geeignet. Aufgrund ihrer Ineffizienz, konnten sich auch die Verwendung bicistronischer Vektorsysteme in der Praxis nicht durchsetzen. Eine multi-Komponenten DNA-Vakzine enthält zwar alle nötigen *cis*,- und *trans* aktiven Elemente, doch besitzen diese Vektoren meist ein bereits zu umfassendes Molekulargewicht (>12kb), welches *in vivo* ebenfalls die Transduktionsrate drastisch reduziert.

D.2.2 Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits ausführlich der Einfluß der Adaption des Kodongebrauchs des Wildtyp gag Gens an das von hochexprimierten Säugetiergenen auf die Expressionsraten in verschiedenen Zellkultursystemen diskutiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß durch die Optimierung des Kodongebrauchs und die dadurch bedingte Zerstörung der die Genexpression limitierenden INS-Sequenzen eine effiziente, Rev/RRE-unabhängige sowie zell,- und gewebsspezifische Expression der viralen Strukturproteine Pr55^{gag} (syngag) und Pr160^{gagpol} (syngagpol) erzielt werden konnte.

D.2.2.1 Induktion effizienter humoraler und zellulärer Immunantworten

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner demonstriert werden, daß mit Hilfe des Kodon-optimierten Expressionskonstrukts pc-syngag, im Vergleich zu herkömmlichen DNA-Vakzine Kandidaten gegen virale Strukturproteine, eine effiziente und konsistente humorale Immunantwort nach i.m. Immunisierung der Plasmid-DNA in Balb/c-Mäusen induziert wird. Dabei war bereits bei einer Dosis von 20µg Plasmid-DNA eine einmalige Auffrischimpfung drei Wochen nach der Primärimmunisierung ausreichend um Gag-spezifische AK-Titer von 1/10.000 zu induzieren. Die induzierte humorale Immunantwort korrelierte dabei bis zu einer Konzentration von 100µg mit der injizierten Menge an Plasmid-DNA. Bereits eine einmalige Immunisierung von 100µg Plasmid-DNA reichte aus, um Gag-spezifische Ig-Titer von 1/1.000 zu induzieren. Zwei weitere Immunisierungen im Abstand von 3 Wochen erzielten letztendlich Ig-Titer von bis zu 1/1.000.000. Wie auch bereits in anderen DNA-Vakzine Studien im murinen Tiermodell demonstriert wurde (zur Übersicht: Ulmer J.B. et al., 1996), induziert die Verabreichung nackter Plasmid-DNA in gepufferten Lösungen generell eine T_H1-polarisierte Immunantwort, die durch die Anwesenheit IgG2a-spezifischer AK (IgG1/IgG2a=<1) im Serum immunisierter Tiere gekennzeichnet ist. In den lymphatischen Organen immunisierter Mäuse konnten Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten gegen nachgewiesen werden, welche zwei bekannte p24-spezifische ZTL-Epitope erkannten. Ferner wurden nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit unterschiedlichen „Recall“-Antigenen inflammatorische und die Proliferation von Antigen-präsentierenden Zellen und T-Lymphozyten stimulierende, typische T_H1-Zytokine, wie z.B. IFN-γ und IL-2 freigesetzt.

In einer, von der Firma Chiron Cooperations (Emeryville, CA USA) durchgeführten vergleichenden Studie unterschiedlicher HI-viraler Gag-Expressionskassetten im Balb/c-Mausmodell, konnte ebenfalls die hohe Immunogenität einer Kodon-optimierten, voll-synthetischen DNA-Vakzine gegenüber herkömmlichen Vakzinekandidaten bestätigt werden (Megede et al., 2000, Otten et al., 2000). Dabei wurden nach einer zweimaligen i.m. Immunisierung von je 20µg synthetischer, Gag kodierender Plasmid-DNA AK-Titer von 1:5.000-1:10.000 erzielt, d.h. um nahezu den Faktor 10 niedrigere Titer als in den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen. Dennoch zeigte diese Studie eindringlich, daß bereits eine minimale Konzentration von 0,2µg Plasmid-DNA ausreicht, um zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung in 50% der Versuchstiere Gag-spezifische Ig-Titer (1:500) zu erzielen. Selbst nach einmaliger Injektion von nur 0,02µg DNA wurden bereits p24-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen induziert (30% bei einer E:T Ratio von 100:1), obwohl hierbei keine Antikörper detektiert wurden. Interessanterweise war die Immunogenität eines alternativen Gag-Expressionskonstrukts, in dem die INS-Sequenzen (p55M1-10) durch gezielte Mutationen zerstört wurden (Schneider et al., 1997), gegenüber herkömmlichen wtgag Genen hinsichtlich der Expressionsrate *in vitro*, sowie der nach 3-maliger i.m. Immunisierung (100µg) induzierten humoralen und zellulären

Immunantwort im Balb/c-Mausmodell ebenso überlegen (Qiu, *et al.*, 1999), wie das voll-synthetische gag Gen in der vorhergehenden und in der in dieser Arbeit vorgestellten Studie. Dabei konnte ferner erstmals demonstriert werden, daß die durch die Gag-spezifische DNA-Vakzine induzierten Antikörper vorwiegend bzw. ausschließlich gegen Regionen innerhalb des Kapsidproteins (p24^{Ka}) gerichtet sind (Qiu *et al.*, 1999). Eine erweiterte Studie, in der unterschiedliche Kodon-optimierte Gag, Pol und Gagpol Konstrukte hinsichtlich Expression und Immunogenität im Balb/c-Mausmodell untersucht wurden, ergab, daß alle DNA-Vakzine Kandidaten identische Gag-spezifische AK-Titer und Gag-spezifische ZTL-Anwort induzieren. Die Pol-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort scheint dagegen am effizientesten induziert zu werden, wenn der –1 ribosomale Leserastersprung zerstört ist und durch eingefügte Mutationen ein Durchlesen des gagpol Leserahmens ermöglicht wird, und ferner, wenn die Protease zudem durch gezielte Mutationen inaktiviert ist (hGag-PolΔFsΔPr) (Huang *et al.*, 2001).

D.2.2.2 Induktion langlebiger Antigen-spezifischer Gedächtniszellen

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß die durch 3-malige i.m. Immunisierung von je 50µg pc-syngag Plasmid-DNA induzierte Gag-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort mit nahezu der gleichen Effizienz noch 5 Monate nach der letzten DNA-Applikation nachzuweisen ist. Die Induktion langlebiger Gedächtniszellen durch DNA-Immunisierung ist in der Literatur wiederholt dokumentiert worden. So war auch die induzierte Immunantwort einer HBsAg-spezifischen bzw. einer Influenza-Nukleoprotein (NP)-spezifischen DNA-Vakzine noch weitere 17 Monate nachweisbar (Raz *et al.*, 1994; Davis *et al.* 1996). Dieser Effekt könnte auf eine langanhaltende Expression viraler Antigen zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang konnte mittels geeigneter Luziferase-Reportersysteme gezeigt werden, daß die Genexpression in den Muskelzellen in Abhängigkeit des verwendeten Promotors und der i.m. verabreichten Dosis bis zu 6-19 Monate stabil ist (Wolff *et al.*, 1992, Danko und Wolff, 1994). Dagegen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Genexpression in anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn, der Leber, Lunge, Gebärmutter, dem Magen, der Niere oder der Milz detektiert werden. Weiterhin ist bekannt, daß die i.m. injizierte Plasmid-DNA bereits innerhalb von 5min von ca. 1-5% der Muskelzellen aufgenommen wird und mitunter bis einem Jahr als extrachromosomales, zirkuläres Molekül in den Muskelzellen nachgewiesen werden kann (Ulmer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993), obwohl dagegen auch gezeigt wurde, daß die Muskelzellen, sei es durch aktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen oder durch die Genexpression *per se*, ca. 10 Tage nach DNA-Immunisierung zerstört werden (Davis *et al.* 1997). Bereits 24h nach Injektion kann die Plasmid-DNA allerdings auch in CD11b⁺/CD80⁺/CD86⁺ mononukleären Zellen (APZ) sowohl innerhalb des Muskelgewebes, als auch in den umliegenden lymphatischen Organen detektiert werden, obwohl in diesen Zellen keine aktive Antigenexpression nachzuweisen ist (Danko und Wolff 1994, Dupuis *et al.*, 2000). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist allerdings noch unklar, ob die zur Aufrechterhaltung langlebiger Gedächtniszellen benötigten Antigen von den direkt transfizierten Muskelzellen oder den, nach Aufnahme der Plasmid-DNA in die lymphatischen Organe eingewanderten APZs, produziert werden.

D.2.2.3 Interne CpG-Motive besitzen keinen Einfluß auf die Immunogenität

Es ist bekannt, daß (i) an der Wobble-Position lentiviraler Kodons anstelle eines Thymins präferentiell ein Cytosin steht und (ii) infolgedessen, G/C-reiche Regionen gegenüber A/T-reiche Sequenzen, stark unterrepräsentiert sind (Haas *et al.*, 1996). Ferner fügt die lentivirale Reverse Transkriptase bevorzugt anstelle eines Guanosins ein Adenin ein („*hypermutation*“) (Vartanian *et*

al., 1991; Wain-Hobson *et al.*, 1995). Dagegen sind C/G Motive mit einer höheren statistischen Wahrscheinlichkeit im Säugetiergenom zu finden. Demzufolge wurde bei der Herstellung synthetischer Gensequenzen durch die Optimierung des Kodongebrauchs der G/C-Gehalt des gag Gens von 45% auf 66% erhöht (Graf *et al.*, 2000). Da allerdings die immunstimulatorischen Eigenschaften, bakterieller DNA bzw. nicht methylierter CpG-Motive der Konsensussequenz Pur-Pur-CpG-Pyr-Pyr bereits seit mehreren Jahren bekannt sind und detailliert untersucht wurden (Messina *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1992; Klinman *et al.*, 1996; Krieg *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996; Yi *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 1997; Pisetsky *et al.*, 1996 und 1999; Hartman und Krieg, 1999), könnten die durch die Kodon-Optimierung eingefügten CpG-Motive einen wesentlichen Beitrag zur hohen Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine leisten. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß durch stille Mutationen der entsprechenden CpG-Motive weder die Gag Expression *in vitro*, noch die Immunogenität *in vivo* beeinflusst wurde. Somit ist die hohe Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine vielmehr auf die gesteigerte Expressionsrate im murinem Tiermodell, als auf interne cis-aktive, immunstimulatorische CpG-Motive zurückzuführen (Deml *et al.*, 2001). Ähnliche Schlußfolgerungen konnten auch andere Arbeitsgruppen aus ihren Ergebnissen ziehen (Vinner *et al.*, 1999; Stratford *et al.*, 2000). Allerdings könnten immunrepressive Sequenzmotive (Krieg *et al.*, 1998), welche auch innerhalb des pcDNA3.1 Vektors zu finden sind, die Wirkung der immunstimulatorischen CpG-Motive aufheben. Eine weitere mögliche Optimierung des Vektorsystems wäre demzufolge die gezielte Inaktivierung negativer Elemente in Kombination mit dem Einfügen immunstimulatorischer CpG-Motive, um auf diese Weise eine weitere Erhöhung der Antigen-spezifischen Immunantwort *in vivo* zu erreichen (Davis *et al.*, 2000).

D.2.2.4 Immunisierungsrouten und Verabreichungsformen der DNA-Vakzine

In den vergangenen Jahren wurde deutlich, daß einige der zunächst als geringfügig erachteten Faktoren, wie z.B. Größe der Injektionsnadel, Volumen und Art der Injektionsflüssigkeit sowie Durchführung der i.m. Immunisierung einen großen Einfluß auf die Genexpression injizierter Plasmid-DNA *in vivo* besitzt (Manthorpe *et al.*, 1993; Wolff *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1993; Levy *et al.*, 1996). Es ist demzufolge nicht verwunderlich, daß auch die Immunisierungsrouten und die Art der Verabreichung der Plasmid-DNA einen erheblichen Einfluß auf die *in vivo* induzierten Immunantworten besitzt.

D.2.2.4.1 Die Immunisierungsmethode beeinflusst die Effektivität der DNA-Vakzine

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine i.m. DNA-Immunisierung des Schienbeinmuskels von zuvor betäubten Versuchstiere bessere und konsistentere Immunantworten induziert als die Injektion der Plasmid-DNA in den Oberschenkelmuskel. Obwohl dieser im Vergleich zum TA Muskel größer erscheint, besteht dieser eigentlich aus vier verschiedenen Muskeln. Zudem ist die Haut in diesem Bereich sehr lose und fettreich, so daß hierbei die Gefahr einer subkutanen (s.k.) Immunisierung besonders hoch ist. Demgegenüber befindet sich der TA Muskel direkt unterhalb der an dieser Stelle sehr straffen Haut. Aus diesem Grund wurden die besten Resultate erfahrungsgemäß durch eine Verabreichung der DNA in den TA Muskel erzielt (Davis 2000; Böhm *et al.*, 1998). Weiterhin dürfte die Betäubung der Mäuse einen positiven Effekt auf die Effizienz der Injektion haben, da dadurch der Muskel auch noch einigen Minuten nach Injektion der Impfflüssigkeit entspannt bleibt und somit eine bessere Aufnahme der DNA gewährleistet sein könnte.

D.2.2.4.2 Die Immunisierungsrouten beeinflussen die Effektivität der Immunantwort

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die subkutane Verabreichung nackter Plasmid-DNA in gepufferten Lösungen, hinsichtlich der absoluten Gag-spezifischen AK-Titer, dem Verhältnis der AK-Isotypen sowie der induzierten CD8⁺ ZTL-Antwort nicht von der i.m. DNA-Immunisierung unterscheidet. Dennoch konnte eine leicht verzögerte humorale Immunantwort und einer reduzierte IFN- γ Freisetzung *nach in vitro* Restimulation der Splenozyten mit „Recall“-Antigenen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, daß die s.k. DNA-Immunisierung von 100 μ g HBsAg-kodierender Plasmid-DNA, eine geringfügig erhöhte ZTL-Antwort, jedoch eine um den Faktor 10 höhere humorale Immunantwort induziert. Insbesondere bei geringen Konzentrationen der verabreichten Plasmid-DNA (10 μ g) wurde der Vorteil der s.k. Immunisierung gegenüber der i.m. Route in dieser Balb/c-Mausstudie verstärkt (Böhm *et al.*, 1998). Mehreren Berichten zufolge, kann die Antigen-spezifische Immunantwort einer i.m. immunisierten DNA-Vakzine durch Verabreichung bestimmter, das Muskelgewebe zersetzender Substanzen, wie z.B. Bupivacain (Vitadello *et al.*, 1994) oder Cardiotoxin (Davis *et al.*, 1993), insbesondere bei niedrigen DNA Dosen, um den Faktor 20-100 gesteigert werden (Coney *et al.*, 1994; Danko *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1995), so daß ferner die Divergenz zur s.k. Immunisierung aufgehoben werden kann (Böhm, *et al.*, 1998). Dabei scheint eine Regenerierung des Muskelgewebes die Aufnahme von DNA-Plasmiden und infolgedessen die Immunogenität zu fördern. Dennoch existieren in der Literatur sehr widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Effizienz der subkutanen Immunisierungsrouten (McCluskie *et al.*, 1999; Böhm *et al.*, 1998). In den letzten Jahren konnte mehrfach demonstriert werden, daß, verglichen mit der i.m. DNA-Immunisierung, insbesondere die intradermale (i.d.) Verabreichung nackter Plasmid-DNA eine effiziente Immunantwort *in vivo* induziert (Raz *et al.*, 1994). Dagegen konnte übereinstimmend weder nach intravenöser (i.v.), intraperitonealer (i.p) oder oraler Immunisierung von Plasmid-DNA eine Immunantwort detektiert werden (McCluskie *et al.*, 1999; Böhm *et al.*, 1998). Im Zusammenhang mit der äußerst niedrigen Halbwertszeit von Plasmid-DNA im Blut und Lymphflüssigkeit ($HWZ_{1/2}$ =30 Sekunden) (Lew *et al.*, 1995) mag die niedrige Effizienz von i.v. und i.p. DNA-Immunisierung kaum verwundern. Zusammenfassend ist die Effizienz der Vakzinierung nackter Plasmid-DNA mit einer raschen Aufnahme durch somatische Zellen, wie z.B. Keratinozyten (i.d.), Stromazellen (s.k.) oder Muskelzellen (i.m.), und/oder infolge von Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle infiltrierter bzw. bereits dort vorhandener APZs, korreliert.

D.2.2.4.3 Die Art der Immunisierung beeinflusst die Polarisierung der Immunantwort

Die Art und Polarisierung der durch die Immunisierung induzierten Immunantwort hängt im wesentlichen von der Methode der Immunisierung ab (Feltquate *et al.*, 1997). So wurde mehrfach demonstriert, daß die Immunisierung nackter Plasmid-DNA in gepufferter Lösung unabhängig von der i.m. bzw. i.d. Immunisierungsrouten, eine T_H1-polarisierte Immunantwort induziert. Dagegen generiert eine, mit Hilfe der „gene-Gun“ in den Muskel oder der Dermis verabreichte Plasmid-DNA eine eindeutige T_H2-polarisierte Immunantwort. Bei dieser Methode, bei der die DNA an inerte Gold-Partikel (0,9-2,6 μ m) konjugiert und unter Druck in das Gewebe injiziert wird (zur Übersicht: Haynes *et al.*, 1996), wird aufgrund einer direkten Transfektion von APZs und/oder somatischer Zellen, um den Faktor 10-1000fach weniger Plasmid-DNA benötigt wird (Robinson *et al.*, 1995; Pertmer *et al.*, 1995; Fynan 1993), um effiziente Immunantworten zu generieren. Jedoch ist die „gene-Gun“-Immunisierung aufgrund der starken T_H2-Polarisierung umstritten, da dadurch dem eigentlichen Vorteil der DNA Vakzine, eine zelluläre, T_H1-polarisierte Immunantwort zu induzieren, nicht mehr gerecht wird. Zudem waren in einigen Fällen die

dadurch induzierten Immunantworten ineffizienter als nach vergleichbarer i.m. Immunisierung der Plasmid-DNA (Deml *et al.*, 2001).

D.2.2.4.4 Liposomen erhöhen die Effektivität der DNA-Vakzine

Eine weitere Möglichkeit, die Menge an benötigter Plasmid-DNA zu reduzieren und gleichzeitig eine effiziente Aufnahme der DNA zu gewährleisten stellt die Komplexierung der negativ geladenen DNA-Moleküle mit kationischen, i.d.R. unilamellaren Lipidkomplexen (Liposomen; $\varnothing < 200\text{nm}$) dar. Diese bestehen aus amphiphilen und neutrophilen Fettsäuremolekülen sowie argininreicher, basischer Polypeptidverbindungen, wie z.B. Protamin, welche die DNA kondensieren und wodurch zugleich die Ausbildung zu großer und damit ineffizienter DNA-Lipid Komplexe verhindert wird (zur Übersicht: Gao und Huang, 1995 und 1996; Lasic, 1998). Die auf diese Weise vor Degradation geschützten DNA-Lipid Komplexe erhöhen nachweislich die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* (Schwartz *et al.* 1999; Brunette *et al.*, 1991, Vitiello *et al.*, 1996 und 1999; Wheeler *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte nach erfolgreicher Optimierung der Lipidformulation demonstriert werden, daß durch die Komplexierung der DNA mit einem Gemisch aus DOTAP, Tween80 und Protamin bereits $\frac{1}{10}$ der entsprechenden i.m. verabreichten DNA-Menge ausreicht, um ebenso effiziente humorale Immunantworten zu induzieren, wie nach i.m. Immunisierung nackter Plasmid-DNA. Obwohl, wie mehrfach bestätigt wurde, eine i.v. Applikation der Plasmid-DNA aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit im Blut als DNA-Immunisierungsrouten ungeeignet ist, wurden die höchsten Gag-spezifischen AK-Titer nach i.v. Immunisierung von DNA-Lipid Komplexen induziert (1:1Mio.). Auch nach i.v. Injektion eines mit Lipiden komplexierten Reporterkonstrukts konnte nach 24h eine Genexpression in der Lunge nachgewiesen werden. Die beobachtete Lymphadenopathie der Milz in mit DNA-Lipid Komplexen i.v., i.m. bzw. s.k. immunisierten Mäusen weist ferner auf hohe zelluläre Immunreaktionen hin. Der Vorzug der liposomalen intranasalen oder oralen Verabreichung von DNA-Vakzinen liegt insbesondere in der Induktion effizienter mukosaler Immunantworten (Gregoriadis *et al.*, 1997; Eldridge *et al.*, 1991; Jones *et al.* 1996 und 1997), welche mit Hilfe der üblichen, standardisierten Impfstoffstrategien nicht oder bislang nur unzureichend induziert werden konnten (Lehner *et al.*, 1992). Insbesondere für eine HIV/AIDS-Vakzine ist aufgrund der sexuellen Übertragung des Virus, eine effiziente mukosale Immunantwort, charakterisiert durch Antigen-spezifische sekretorische IgA und IgG Antikörper sowie auch zelluläre Immunreaktionen in der Mukosa, von großer Bedeutung. (Ishii *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 1997; Klavinskis *et al.*, 1997).

D.2.2.5 DNA-Vakzine versus Immunisierung Virus-ähnlicher Partikel (VLPs)

Wie bereits von anderen Modellbeispielen, wie z.B. Hepatitis B Virus bekannt ist, sind partikuläre, Lipid-haltige Antigenaggregate hoch-immunogen und besitzen ferner immunstimulatorische Eigenschaften *in vivo* (Schirmbeck *et al.* 1994). Auch das kovalent in der Plasmamembran verankerte Pr55^{gag}-Polyprotein ist in der Lage Virus-ähnliche Partikel (VLPs) in eukaryontischen Zellen und Insektenzellen auszubilden (Gheysen *et al.*, 1989; Smith 1990; Wagner *et al.* 1992). In den vergangenen Jahren konnten in unterschiedlichen Tiermodellen, wie z.B. Kaninchen, Balb/c-Mäusen und Primaten (*Macaca fascicularis*) gezeigt werden, daß die Verabreichung von Pr55^{gag}-VLPs, welche aus dem Überstand von mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen aufgereinigt worden waren, effiziente Gag-spezifische humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren (Wagner *et al.*, 1992, 1994 und 1996; Deml *et al.* 1997; Notka *et al.*, 1999).

D.2.2.5.1 Der Vorteil von „DNA-Prime/Protein-Boost“ Strategien

In der vorliegenden vergleichenden Studie konnte gezeigt werden, daß eine s.k. Immunisierung mit 5µg aufgereinigter Pr55^{gag}-VLPs signifikant höhere Gag-spezifische AK-Titer induziert, als eine i.m. Immunisierung (*Quadriceps*) mit je 100µg Plasmid-DNA (Faktor 100). Obwohl die Applikation der DNA-Vakzine in den *Quadriceps* Muskel generell um den Faktor 10-100 ineffizienter ist und eine vergleichbare DNA-Immunisierung des Schienbeinmuskels i.d.R. durchschnittlich AK-Titer von 1:500.000-1.Mio. induziert, kann trotz dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, daß die pc-syngag DNA-Immunisierung eine ebenso effiziente humorale T_H1-polarisierte Immunantwort induziert als eine Vakzinierung mit Pr55^{gag}-VLPs. Verschiedene „Prime/Boost“-Verfahren zeigten ferner, daß die durch DNA-Immunisierung initial induzierte humorale Immunantwort durch eine Immunisierung mit Pr55^{gag} VLPs wesentlich effizienter gesteigert werden kann, als nach einer wiederholten Immunisierung mit Plasmid-DNA. Aufgrund dieser und auch anderer Studien in verschiedenen Tiermodellen, gilt es als erwiesen, daß, nach einer primären Immunisierung mit Antigen-kodierender Plasmid-DNA und einer Auffrischimpfung mit rekombinanten Viren, wie z.B. Canarypox Virus oder MVA („modified Vaccinia Ankara“), oder rekombinantem Protein, eine effizientere humorale und zelluläre Immunantwort *in vivo* induziert werden, als durch eine entsprechende DNA/DNA bzw. Protein/Protein Vakzinierung (Robinson 1999 und 2000; Amara *et al.*, 2001; Melors *et al.*, 1996; Qinn *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2000; Ruitenberg *et al.*, 2000; Letvin *et al.*, 1997) Diese „DNA-Prime/Protein-Boost“ Verfahren stellen aufgrund der erhöhten Immunogenität viraler Antigene eine vielversprechende Immunisierungsstrategie kombinierter HIV/AIDS-Vakzine Kandidaten dar.

D.2.2.5.2 Pr55^{gag}-VLPs als Komponente eines kombinatorischen HIV/AIDS-Vakzine Konzepts

Auch die Virus-ähnlichen Partikel selbst stellen eine interessante Komponente eines HIV/AIDS-Vakzine Konzepts dar. So konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gezeigt werden, daß naive Splenozyten nach Zugabe von VLPs Antigen-unspezifisch die T_H1-Zytokine IFN-γ, IL-12 und IL-2, sowie IL-6 sezernieren. Ferner wurden durch die Ko-Immunisierung eines Proteinfragmentes (CD) eines Gelbfiebervirus Antigens mit Pr55^{gag}-VLPs die Antigen-spezifischen AK-Titer um den Faktor 10 erhöht. Während die Immunisierung des Proteinfragmentes eine eindeutige T_H2-polarisierte Immunantwort induzierte, konnte durch Ko-Verabreichung von VLPs eine Verschiebung der T_H-Polarisierung (T_H2→T_H1) beobachtet werden. Dieser immunstimulatorischen Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vitro* und *in vivo* ähnelt dabei denjenigen der CpG-ODNs: In beiden Fällen wird die Freisetzung T_H1-spezifischer Zytokine induziert, die wiederum ein Zytokinmilieu *in vivo* generiert, welches die Induktion Antigen-spezifischer zellvermittelter Immunantworten gegen virale Proteine stimuliert. Interessanterweise wurden erst kürzlich die immunstimulatorischen Eigenschaften des Baculovirus Hüllproteins gp64 („Interferon stimulating protein“; ISP), welches für die Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zytoplasmamembran und somit für die Infektion der Zielzelle verantwortlich ist (Blissard und Wenz, 1992), beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß das Baculovirus-spezifische Protein gp64 sowohl die Sekretion von Typ I (IFN-α und IFN-β) als auch Typ II (IFN-γ) Interferon *in vitro* und *in vivo* sowohl in murinen als auch in humanen Zellen stimuliert (Gronowski *et al.*, 1999), wodurch die induzierte Stimulation Antigen-spezifischer Immunantworten nach Immunisierung erklärt werden könnte (Heath und Playfair, 1992). Mit Hilfe eines gp64-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Hohmann und Faulkner, 1983; Monsma und Blissard 1995) konnte das Baculovirus-spezifische, IFN-stimulierende Hüllprotein

gp64 in den jeweiligen aufgereinigter Pr55^{gag}-VLPs Proben nachgewiesen werden. Dabei könnte es sich zum einen um Verunreinigungen der aufgereinigten Pr55^{gag}-Partikel mit Baculoviren ähnlicher Dichte handeln, da auch in gleicher Weise aufgereinigte Überstände von mit Wildtyp-Baculoviren infizierten Insektenzellen das Hüllprotein in großer Menge nachzuweisen war. Andererseits könnte das gp64 Hüllprotein ebenfalls ein integrierter Bestandteil der Lipidhülle der VLPs und auf der Oberfläche exponiert sein. Ferner wurden auch gp64-spezifische Antikörper im Serum von mit Pr55^{gag}-Partikeln immunisierten Balb/c-Mäusen nachgewiesen. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse die immunstimulatorischen Eigenschaften der Pr55^{gag}-VLPs *in vitro* und *in vivo*, zeigen jedoch zudem dessen Limitationen für die Verwendung als potentieller HIV/AIDS-Impfstoff auf, da die zugrundeliegenden Komponenten und Mechanismen bislang nur unzureichend identifiziert sind und eine Verunreinigung mit Baculoviren nicht ausgeschlossen werden kann. Obwohl Baculoviren ausschließlich in Insektenzellen (*Lepidoptera*) replizieren (McIntosh und Shamy 1980; Tjia *et al.*, 1983; Volkman und Goldsmith 1983), sind sie in der Lage auch eukaryontische Zellen zu infizieren und ihre DNA in den Zellkern einzubringen (Groner *et al.*, 1984; Tjia *et al.*, 1983; Volkman und Goldsmith, 1983). Aus diesen Gründen ist eine Zulassung der auf diese Weise aufgereinigten VLPs für humane Immunisierungsstudien fraglich. Demgegenüber scheint die DNA-Immunisierung mit dem Kodon-optimiertem pc-syngag Expressionskonstrukt ebenso effiziente humorale wie auch zelluläre Immunantworten zu induzieren als die Pr55^{gag} VLPs, so daß die Pr55^{gag} DNA-Vakzine als eine optimale Alternative zur der Immunisierung mit Pr55^{gag}-VLPs angesehen werden kann.

D.2.2.6 Insertion zusätzlicher immunogener Polypeptide

Bereits bei der Entwicklung geeigneter Spaltvakzine oder Virus-ähnlicher Partikel wurde versucht, zusätzliche Proteinfragmente zu integrieren und somit eine Vielzahl immunogener Epitope bereit zu stellen, um auf diese Weise vielschichtigere Immunantworten zu induzieren (Wagner *et al.*, 1994 und 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch das Anfügen zusätzlicher für die HI-virale V3-Schleife des gp120 Moleküls kodierenden Gensequenzen an die synthetische gag Sequenz weder die Expression, die Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel, noch die nach Immunisierung induzierte Gag-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort beeinflusst wird. Zudem konnte eine V3-spezifische CD8⁺ zytotoxische, T-Zellantwort *in vivo* induziert werden. Da in anderen Studien entsprechende um die V3-Schleife erweiterte Virus-ähnliche Partikel (AcB4) im Balb/c-Mausmodell ebenfalls V3-spezifische Antikörper induzieren (V. Hermann, Diplomarbeit IMMh Regensburg), kann davon ausgegangen werden, das nach DNA-Immunisierung von pc-syngagV3/IIIB ebenfalls V3-spezifische humorale Immunantworten induziert werden können. Anhand dieses Beispiels konnte demonstriert werden, daß durch die Integration zusätzlicher kodierender Gensequenzen, eine effiziente Immunantwort induziert werden kann.

D.3 Strategien zur Modulation und Optimierung des pc-syngag Expressionsvektors

Wie bereits ausführlich diskutiert wurde, kann durch die Anpassung des Kodongebrauchs viraler Gene an das von hochexprimierten Säugetiergenen die Proteinexpression *in vitro* und *in vivo* gesteigert werden. Das HI-virale gag Gen stellt dabei mit Sicherheit ein besonderes Beispiel dar, da die Wildtyp-RNA-Sequenzen cis-aktive Signale besitzen, die in Abwesenheit des viralen Regulatorproteins Rev zur nukleären Degradation der pre-mRNA führen. Dennoch konnte auch für andere HIV-spezifische (Haas *et al.*, 1996; Vinner *et al.*, 1998) und nicht HIV-spezifische Antigene gezeigt werden, daß eine Optimierung des Kodongebrauchs zur Erhöhung der Genexpression *in vitro* und der Immunogenität *in vivo* beiträgt (Stratford *et al.*, 2000).

D.3.1 Modulation der zellulären Lokalisation und die Auswirkungen auf die Immunogenität *in vivo*

Ebenso wie die zellulären Proteine sind auch die verschiedenen, HI-viralen Antigene in unterschiedlichen Kompartimenten der Wirtszelle lokalisiert. Während die regulatorischen Genprodukte, wie z.B. Rev und Tat nukleär lokalisiert sind, werden die Hüllproteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert und über den sekretorischen *Pathway* auf die zelluläre Oberfläche transportiert (gp120, gp41). Die HI-viralen Strukturproteine Gag und GagPol werden ferner zielgerichtet an die Zytoplasmamembran transportiert und dort über einen Myristylsäurerest kovalent verankert. Unter der Voraussetzung, daß die unterschiedliche Kompartimentierung der Antigene deren Immunogenität *in vivo* beeinflusst, müßten demnach Veränderungen der ursprünglichen zellulären Lokalisation *in vivo* die Immunantwort modulieren können.

D.3.1.1 Die Pr55^{gag}-Partikelfreisetzung *in vivo* hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Immunogenität der Gag-spezifischen DNA-Vakzine

In der vorliegenden Arbeit konnte übereinstimmend mit anderen Veröffentlichungen gezeigt werden, daß eine singuläre Mutation des N-terminalen Gylzinrests (Gly₂) von Gag die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln inhibiert, da die Polyproteine nicht mehr myristyliert und kovalent in der Zytoplasmamembran verankert werden können (Lee *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 1993). Ferner wurde in den DNA-Immunisierungsstudien nachgewiesen, daß durch die Inhibition der Partikelfreisetzung dennoch effizientere Gag-spezifische AK-Titer und auch eine geringfügig erhöhte ZTL-Antwort *in vivo* induziert werden konnte. Die Freisetzung Virus-ähnlicher Partikel *in vivo* ist demzufolge keine essentielle Voraussetzung für die Effizienz und die T_H1-Polarisierung der Immunantwort einer Gag-spezifischen DNA-Vakzine. Obwohl der zugrundeliegenden Mechanismus der Immuninduktion nur unzureichend bekannt ist, wäre es hierbei vorstellbar, daß die erhöhte humorale und CD8⁺ ZTL-Antwort aufgrund der *in vitro* beobachteten Akkumulation des myristylierungsdefekten Gag Proteins in direkt transfizierten APZ und einer infolge gesteigerten, proteasomalen Degradation bzw. MHC-Klasse I Präsentation, zustande kommt. Ferner könnte die Akkumulation großer Mengen *in vivo* exprimierten, myristylierungsdefekten Gag Proteins direkt unterhalb der Zytoplasmamembran zu zytotoxischen Effekten und dadurch zur Freisetzung löslicher Gag Protein aus lysierten, somatischen Zellen führen, wobei durch „Cross-Priming“-Effekte, eine effizientere MHC-Klasse II restringierte, humorale Immunantwort

kodierenden Expressionskonstrukte. Die im Vergleich zum ebenfalls intrazellulär lokalisiertem Gag Polyprotein beobachtete Reduktion der Gag-spezifischen AK-Titer (Faktor 2) könnte entweder auf eine verringerte Anzahl immunogener B-Zellepitope oder einer verminderten Zytotoxizität und infolgedessen reduzierte „Cross-Priming“ Effekte durch freigesetztes Antigen zurückgeführt werden. Obwohl bekannt ist, daß die nach i.m. DNA-Immunisierung induzierten Gag-spezifischen Antikörper vornehmlich gegen die p24-Region gerichtet sind (Qiu *et al.*, 2000), wäre es dennoch vorstellbar, daß zusätzliche T_H-Zellepitope außerhalb dieser Region, die p24-spezifische Immunantwort erhöhen könnten. Dieser Umstand könnte ebenfalls die Ursache dafür sein, daß trotz erhöhter ZTL-Antwort, die allgemeinen, zellulären Immunreaktionen nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten aus mit pc-synp24 immunisierten Versuchstieren mit verschiedenen „Recall“-Proteinen signifikant reduziert waren.

D.3.1.3 Zielgerichteter Transport HI-viraler Antigene in das ER: Immunogenität sekretorischer Antigene

Unter der Voraussetzung, daß „Cross-Priming“-Effekte eine wichtige Rolle bei der Induktion einer initialen Immunantwort besitzen, müßten demnach sekretorische Proteine eine effizientere humorale Immunantwort induzieren, als zytoplasmatisch lokalisierte Antigene. Inwieweit sich Modulationen der intrazellulärer Kompartimentierung auf die Immunogenität *in vivo* auswirken, wurde in der vorliegenden Arbeit durch das Anfügen einer N-terminalen ER-Signalsequenz an das jeweilige HI-virale Antigen untersucht.

D.3.1.3.1 Generierung sekretorischer HI-viraler Antigene

Die verschiedenen, N-terminalen Signalsequenzen der sekretorischen Proteine und Plasmamembranproteine eukaryontischer Zellen sind i.d.R. 13-36 AS lang und besitzen einen zentralen hydrophoben Bereich (z.B. Leucin, Valin, Isoleucin), eine N-terminale positiv geladenen Aminosäure (z.B.: Arginin, Lysin), sowie eine C-terminale, stark polare Abspaltungssequenz, wobei an Position -3 und -1 zumeist Alanin, aber auch Cystein, Threonin, Serin und Glycin zu finden sind. Diese Signalsequenz ermöglicht die ko-translationale Translokation des Proteins in das ER. Anschließend wird das Signalpeptid, welches als „Transfer-Start“-Signal dient und bislang im membrangebundenen Translokationskomplex verblieb, durch eine ebenfalls membrangebundene Alanin-spezifische Signalpeptidase abgespalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Expressionskonstrukte generiert, die für das Polyprotein Pr55^{gag}, das myristylierungsdefekte Pr55^{gag} sowie das Kapsidantigen p24^{KA} kodieren, welche N-terminal ein 16 AS umfassendes Signalpeptid des 19kDa E3 Proteins, einem adenoviralen (Ad2), ER-lokalisiertem Virulenzfaktor, tragen (MRYMILGLLALAAVCSA/A). Diese Signalpeptid wurde, wie auch das des zellulären, 21 AS umfassenden Plasminogen Aktivator Proteins (tPA, „tissue plasminogen activator“: MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSA/R) (Shiver *et al.*, 1996; Heile *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999) bereits in anderen Studien zur Modifikation von Proteinen verwendet (Snyder *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 1998). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Expressionsrate aller Fusionsproteine sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* erhöht. Es ist vorstellbar, daß durch den Fusionsanteil die Translationseffizienz aufgrund „günstigerer“ Sekundärstrukturen an der Initiationsstelle erhöht wurde. Insbesondere G/C-reiche Sequenzen, wie sie vor allem in synthetischen Genen vorkommen, bilden vielfach ausgeprägte Sekundärstrukturen aus, wodurch die Translationsinitiation reduziert wird (Kozak *et al.*, 1986, 1989, 1991 und 1994). Weiterhin wurde demonstriert, daß HI-virale Antigene, welche eine ER-Signalsequenz besitzen, mit dem

Markerprotein des Endoplasmatischen Retikulums, Calnexin, ko-lokalisieren, und zudem als Sekretproteine in den Überstand sezerniert werden. Im Gegensatz zum sekretorischen 24kDa Kapsidantigen konnten für die Pr55^{gag} Polyproteine zwei dominante, sekretorische Gag Isoformen detektiert werden. Die Hypothese, daß es sich hierbei ausschließlich um das Pr55^{gag} Protein mit (55kDa + 2kDa) bzw. ohne Signalpeptid (55kDa) handelt ist aufgrund der molekularen Größenunterschiede unwahrscheinlich. Interessanterweise, konnte innerhalb der p17^{MA}-Domäne (119-123aa.) eine N-Glykosylierungsstelle [NKS^{gag}KK] (Marshall *et al.* 1972) identifiziert werden. Eine partielle Glykosylierung des Gag Proteins würden die Beobachtungen erklären. Die Akkumulation der höher-molekularen Gag-Isoform während der Inhibition der Sekretion unterstützt diese These, da möglicherweise aufgrund der Retention der Proteine im ER die Wahrscheinlichkeit einer N-Glykosylierung erhöht wird. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß alle rekombinanten und modifizierten HI-viralen Antigene als Sekretproteine von den Zellen freigesetzt werden, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine Anteil der 55kDa-Vorläuferproteine zusätzlich post-translational, wie z.B. durch N-Glykosylierung, im ER modifiziert wird.

D.3.1.3.2 Sekretorisches p24^{KA} induziert eine T_H2-polarisierte Immunantwort *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit konnte in den Immunisierungsstudien gezeigt werden, daß die Sekretion des 24kDa HI-viralen Kapsidantigen (sc-p24^{KA}) zwar zu einer geringfügigen Erhöhung Gag-spezifischer AK-Titer führt, jedoch dabei eine, im Vergleich zu dem zytoplasmatisch lokalisiertem p24^{KA} (zy-p24^{KA}), um 50% reduzierte CD8⁺-zytotoxische T-Zellantwort induziert. Die ebenfalls beobachtete, reduzierte IFN- γ Sekretion nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten, weist auf drastisch verringerte zelluläre Immunreaktionen hin, die, wie ebenfalls gezeigt wurde, auf einer Verschiebung der T_H-Polarisierung („T_H1 \rightarrow T_H2 Shift“) begründet sind. Dieses Ergebnis korreliert mit dem gegenwärtigem Modell der Immuninduktion, daß die von somatischen Zellen freigesetzten, sekretorische Antigene durch „Cross-Priming“ Effekte ein MHC-Klasse II restringierte Immunantwort induzieren und die MHC-Klasse I Präsentation in direkt transfizierten APZ aufgrund ihrer ER-Lokalisation reduziert ist (Wang *et al.*, 1999)).

D.3.1.3.3 Sekretorisches Gag Protein induziert eine effiziente T_H2-polarisierte humorale und zelluläre Immunantwort

Auch das *in vivo* exprimierte, sekretorische Gag Protein (sc-Pr55^{gag}) induziert im Gegensatz zum zytoplasmatischem (zy-Pr55^{gag}) bzw. partikulärem Gag (pa-Pr55^{gag}), eine T_H2-polarisierte Immunantwort, die durch eine Erhöhung Gag-spezifischer AK-Titer charakterisiert ist. Allerdings konnte keine Reduktion der p24-spezifischen CD8⁺-zytotoxischen T-Zellantwort nachgewiesen werden. Obwohl in der von Qiu *et al.*, (2000) veröffentlichten Arbeit ebenfalls ein „T_H1 \rightarrow T_H2 Shift“ für das *in vivo* exprimierte, sekretorische Pr55^{gag} Protein beschrieben wurde, waren, neben der humoralen Immunantwort auch die zellulären p24-spezifischen T-Zellreaktionen, gegenüber dem zytoplasmatischen Gag-Protein um das 2-3fache erhöht. Dabei ist nach der gegenwärtigen Meinung, eine deutlich erhöhte ZTL-Antwort in keinsten Weise mit der beobachteten T_H2-polarisierten Immunantwort zu vereinbaren. Demgegenüber konnten, in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, auch andere Arbeitsgruppen zeigen, daß die nach DNA-Immunisierung *in vivo* exprimierten sekretorischen Antigene eine Erhöhung der T_H2-polarisierten, humoralen Immunantwort, geprägt von einer reduzierten IFN- γ Sekretion der Immunzellen der Milz und des Lymphknotens, zur Folge haben (Lewis *et al.*, 1999).

D.3.1.3.4 Das Syntheseprodukt der internen Translationsinitiation p40* ist essentiell für die Induktion einer p24-spezifischen CD8⁺ ZTL-Antwort

In eukaryontischen Zellen wird die Translation der mRNA gewöhnlich an demjenigen AUG Kodon (Met₁) initiiert, welches dem 5'-Ende am nächsten liegt („*first AUG rule*“). Die Effizienz dieser, von der am 5'-Ende befindlichen 7-Methylguanosinum-Kappe abhängigen Translationsinitiation ist dabei im wesentlichen von der Länge des nicht-kodierenden Bereichs (i.d.R. ca. 50-100 nt.), der Ausprägung von mRNA-Sekundärstrukturen in dem den Translationsstart umgebenden Bereich, sowie von einer definierten Konsensus-Sequenz in direkter Umgebung des Startkodons („Kozak-Sequenz“) abhängig. In einigen Fällen jedoch kann diese Regel gebrochen, und die Translation an einem anderer AUG Kodon initiiert werden. Neben der Reinitiation und dem Überlesen des ersten AUG Kodons („*leaky scanning*“) bei dicht aufeinanderfolgenden Initiationskodons (Kozak *et al.*, 1987 und 1995), können auch internen Bindestellen für die 40S ribosomale Untereinheit („*internal ribosomal binding site*“ (IRES)) eine alternative Translationsinitiation initiieren. Erst kürzlich wurde eine solche IRES innerhalb der für das p24-Kapsidprotein kodierenden Region (ATG₁₄₂) identifiziert, die eine Cap-mRNA unabhängige Translationsinitiation gewährleistet, und infolgedessen zur Expression einer verkürzten, zytoplasmatischen 40kDa Gag-Isoform (p40*) führt (Buck *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls durch Mutation des internen AUG Startkodons (Met₁₄₂→Cys₁₄₂) innerhalb der Sequenz des sekretorischen Gag Proteins, die potentielle IRES zerstört, und die Expression eines ca. 40kDa-umfassenden, zytoplasmatisch lokalisierten Gag-spezifischen Proteins *in vivo* inhibiert werden (sc-Pr55^{gag}Δ1/142). Der Verlust des Syntheseprodukte p40* führt zu einem nahezu vollständigem Verlust der p24-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort sowie zu einer reduzierten IFN-γ Sekretion *in vitro* restimulierter Splenozyten in mit dem entsprechendem Expressionsvektor immunisierten Mäusen. Demzufolge, trägt das zytoplasmatische p40* Protein (KA-p2-NC-p2-LI) wesentlich zur Induktion der p24-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellantwort des Gag Proteins *in vivo* bei. Im Gegensatz dazu hatte eine entsprechende Mutation innerhalb des sekretorischen Kapsidproteins, keine weitere, signifikante Auswirkung auf die Expression und die Immunogenität des p24^{KA}-Sekretproteins. Die unterschiedliche Entfernung des internen AUG Kodons von dem Cap-abhängigen ersten Startkodon der Translation (Sc-Pr55^{gag}: 270 nt./ sc-p24^{KA}: 84 nt.) könnten diesen unterschied erklären, wobei möglicherweise die IRES innerhalb der p24-spezifischen mRNA weniger effizient *in vivo* genutzt wird, als die IRES der Gag-spezifischen RNA. In der bereits zuvor erwähnten Studie von Qiu *et al.* (2000) wurden keine voll-synthetischen, sondern lediglich partiell synthetische Rev/RRE-unabhängige Gag Expressionskonstrukte, welche zudem alle in unmittelbarer Nachfolge des AUG₁ das ursprüngliche Startkodon besitzen, verwendet. Dadurch ist die veröffentlichte Studie nicht unbedingt vergleichbar, mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die *in vivo* Expression eines artifiziellen, sekretorische Antigens, in ähnlicher Weise wie eine Spaltvakzine, generell T_H2-polarisierte Immunantworten, charakterisiert durch, im Vergleich zu zytoplasmatischen und partikulären Antigenen, erhöhte AK-Titer und verringerter zellulärer Immunantworten generiert. So induziert z.B. auch ein durch DNA-Immunisierung *in vivo* exprimiertes, sekretorisches FrC Protein des Tetanus Toxins, eine ebenso effiziente humorale Immunantwort, wie das Toxoid selbst (Rice *et al.*, 1999). Auch andere Studien bestätigten, daß die Expression sezernierter Proteine im Vergleich zu zellulär assoziierten Antigenen, wie z.B. zytosolische Proteine oder Membranproteinen, höhere Antigen-spezifische AK-Titer *in vivo* induziert, und infolgedessen selbst mittels DNA-Vakzinierung eine T_H2-polarisierte Immunantwort induziert werden kann (Lewis *et al.*, 1999; Rice *et al.*, 1999; Heile *et al.*, 2000). Für die Entwicklung einer DNA-Vakzine, die in erster Linie eine effiziente

zelluläre Immunantwort induzieren soll, ist diese Methode der Modifikation allerdings ungeeignet. Das HI-virale 55kDa Gag Protein bildet dabei aufgrund einer internen IRES, welche für die Expression einer immunogenen, intrazellulären p40* Isoform verantwortlich ist, eine Ausnahme, da nach i.m. Immunisierung der für das sekretorische Gag Protein kodierenden Plasmid-DNA, trotz Induktion einer typischen T_H2 -polarisierten Immunantwort, die p24-spezifische $CD8^+$ -zytotoxische T-Zellantwort unverändert bleibt.

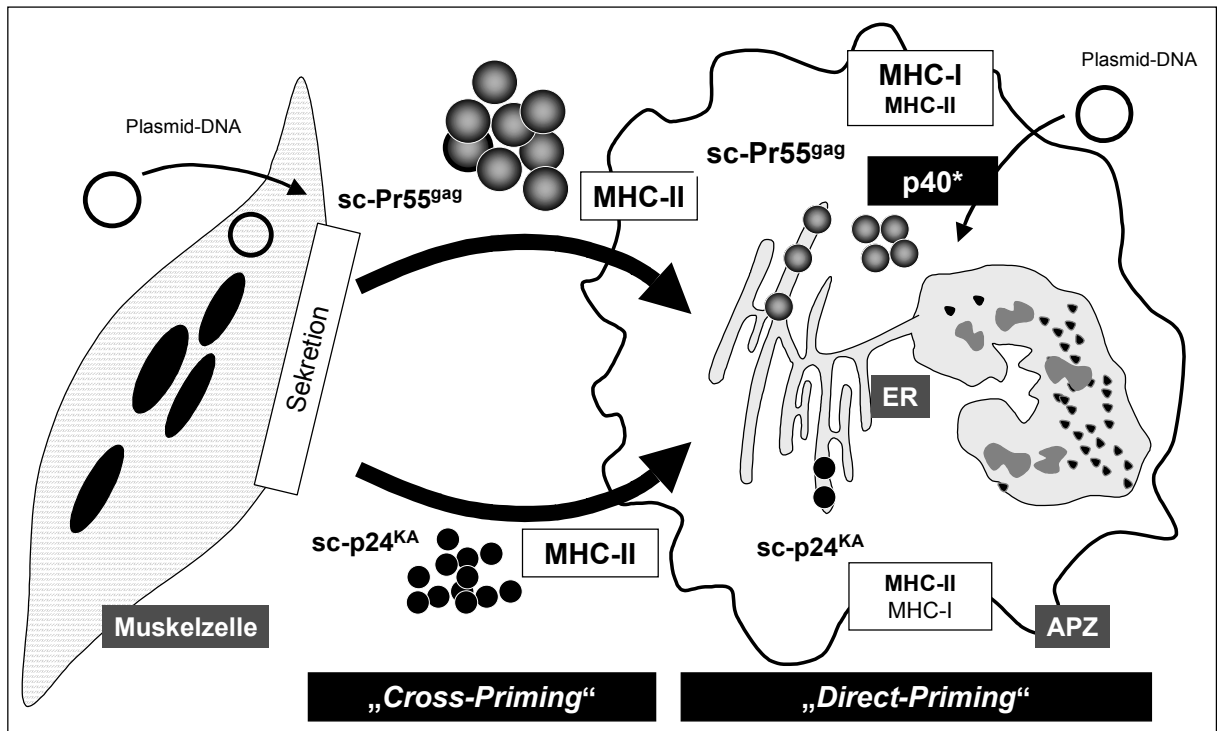


Abbildung D-4 Hypothetischer Mechanismus der Immuninduktion durch sekretorisches 55kDa Gag Protein und 24kDa Kapsidprotein. Direkt transfizierte somatische Zellen, wie z.B. Muskelzellen sezernieren große Mengen lösliches Antigen, welches von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen wird (Cross-Priming) und eine typische MHC-Klasse II restringierte T_H2 -polarisierte Immunantwort induziert. Direkt transfizierte APZ können Sekretproteine nachweislich nur sehr ineffizient prozessieren und MHC-Klasse I und MHC-Klasse II restringiert präsentieren, so daß Sekretproteine im allgemeinen nur eine sehr geringe zelluläre Immunantwort induziert. Durch die interne Translationsinitiationsstelle (IRES) innerhalb der gag kodierenden mRNA werden allerdings gleichzeitig zytoplasmatische p40* (KA-p2-NC-p1-LI) Isoformen synthetisiert, welche als Quelle MHC-Klasse I restringierter p24-spezifischer Immunantworten dienen.

D.3.2 „Minigen-Immunisierung“: Induktion einer Epitop-spezifischen $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellantwort in vivo

Minigene sind kurze, für isolierte immunogene Epitope kodierende Genkassetten, welche sich ursprünglich von der Peptid-Vakzinierung abgeleitet haben (zur Übersicht: An und Whitton, 1999). Im Tiermodell konnte durch die Vakzinierung mit Minigenen, welche nicht nur für ein einziges Epitop (= **monovalente Minigene**), sondern auch für bis zu 10 verschiedene, direkt aneinandergereihte T_H -, ZTL- und B-Zellepitope kodieren können (=multivalente Minigene; „**Polytop**“), ein Schutz vor Infektion mit dem entsprechendem viralen bzw. bakteriellen Krankheitserreger, induziert werden. Nachweislich ist eine Vakzinierung mit rekombinanten Vakzinia-Vektoren (rVV) hierfür wesentlich effizienter als die Immunisierung nackter Plasmid-DNA. (Klavinskis et al., 1990; Del Val et al., 1991; Whitton et al., 1993; An et al., 1997; Yu et al., 1998; Shurbier, 1997).

D.3.2.1 Induktion einer isolierten zytotoxischen T-Zellantwort

Die Präsentation immunogener Epitope, komplexiert mit MHC-Klasse I Molekülen, auf der Oberfläche von APZs, setzt eine proteasomale Degradation intrazellulärer Antigene sowie einen TAP-abhängigen Transport (TAP; „*transporters associated with antigen processing*“) in das ER voraus (zur Übersicht: Rock und Golberg., 1999; Yewdell und Bennink, 1999). Während der murine TAP-Transporter, unabhängig von der Größe des Peptids, eine Präferenz für hydrophobe C-Termini (I, L, V, F) besitzt, werden dagegen in humanen Zellen sowohl Peptide mit hydrophoben als auch mit positiv (K, R) geladenen, C-terminalen Aminosäureresten TAP-abhängig in das ER transportiert. Während das Peptid C-terminal bereits mit dem ER-ständigen MHC-Klasse I Molekül assoziiert ist, spaltet eine ER-ständige Aminopeptidase selektiv den N-Terminus der Peptide, so daß auf diese Weise exakte Nonamere generiert werden, die zu einer erhöhten Stabilität der MHC-Klasse I/Peptid Komplexe führen („*C-end rule*“) (Yewdell *et al.* 1998; Snyder 1994 und 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Balb/c-Mausmodell demonstriert werden, daß die i.m. Immunisierung monovalenter Minigene, welche für das p24-spezifisches ZTL-Epitop A9I^{p24/1} bzw. das V3-spezifische ZTL-Epitop R10I^{V3/IIIb} kodieren, die aufgrund einer N-terminalen ER-Signalsequenz ko-translational in das Lumen des ERs transloziert werden, eine Epitop-spezifische und isolierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort *in vivo* induziert. Ferner wurden hierbei keine spezifischen Antikörper nachgewiesen (Iwasaki *et al.*, 1998). Seit langem ist bekannt, daß durch das Anfügen einer ER-Signalsequenz, unabhängig von der Immunisierungsrouten (i.m., i.d. *gene gun*), eine wesentlich effizientere ZTL-spezifische Immunreaktion gegen ein isoliertes Epitop induziert wird, als gegen ein entsprechendes, zytoplasmatisch lokalisiertes Epitop (Restifo *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 1994; Ciernik *et al.*, 1996; Iwasaki *et al.*, 1998, Rodriguez *et al.*, 1998). Dadurch kann aufgrund einer direkten, TAP-unabhängigen Translokation immunogener Epitope, eine nachweislich größere Anzahl von MHC-Klasse I Komplexen auf der Oberfläche präsentiert werden (Yewdell *et al.* 1998). Auch eine durch Ubiquitin-Modifikationen induzierte proteasomale Degradation erhöht nachweislich die MHC-Klasse I Präsentation, und infolge die Immunogenität der Minigene *in vivo* (Rodriguez *et al.*, 1998). Dennoch bleibt fraglich, welche Modifikationen für monovalente und welche für multivalente Minigene besser geeignet sind. Da auch ER-ständige Proteine bzw. Polypeptide nach einem retrograden Transport in das Zytoplasma, Ubiquitin-abhängig proteasomal degradiert werden (zur Übersicht: Sommer und Wolf, 1997; Plemper und Wolf, 1999), und infolgedessen die Präsentation immunogener ZTL-Epitope dennoch TAP-abhängig ist (Bacik *et al.*, 1997) wäre es denkbar, daß eine durch Ubiquitin-Modifikation gewährleistete, rasche zytoplasmatische Degradation multivalenter Peptide (>10 Epitope) eine effizientere Immunantwort induziert, als ein direkter Transport der Polytope in das ER. Auf der anderen Seite wäre ein TAP-unabhängiger, direkter ko-translationaler Transport für monovalente Minigene sinnvoller. Die Beteiligung spezieller Proteasen, wie z.B. der Ntn-Hydrolasen („*N-terminal nucleophile hydrolases*“) des Proteasoms und ER-ständiger Peptidasen, an der Generierung immunogener MHC-Klasse I Epitope, impliziert die Bedeutung von Epitop-flankierenden Sequenzen (Holzhutter *et al.*, 1999; Theobald *et al.*, 1998, Yellen-Shaw *et al.*, 1997; Gileadi *et al.*, 1999, Neisig *et al.*, 1995; Eggers *et al.* 1995; Del Val *et al.*, 1991; Beekman *et al.*, 2000). So konnte erst kürzlich im Mausmodell gezeigt werden, daß insbesondere die Immunogenität multivalenter Minigene durch das Einfügen einer definierten „*Spacer*“-Region (-AAY-) zwischen den einzelnen Epitopen, gesteigert wird (Velders *et al.*, 2001).

D.3.2.2 Immundominanz HI-viraler Epitope

Seit langem ist bekannt, daß es hinsichtlich der Immunogenität zwischen verschiedenen Epitopen wesentliche Unterschiede gibt (zur Übersicht: Yedwell und Bennink 1999). So konnte z.B. für des Nukleoprotein (NP) von Influenza gezeigt werden, daß über 2.000 Kopien des Epitops NP₅₀₋₅₇, jedoch nur 30 Kopien des Epitops NP₁₄₇₋₁₅₅ mit MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche komplexiert sind (Yewdell *et al.*, 1998). Dafür sind u.a. die Spezifität proteasomaler Degradation und des TAP-Transports verantwortlich, wodurch bereits die Anzahl möglicher Peptide im ER reduziert wird (Yellen-Shaw *et al.*, 1997). Ferner besitzen die Peptide variablen Bindungsaffinitäten zu den MHC-Klasse I Molekülen ($K_d=50\text{-}500\text{nM}$). Aufgrund des individuell, begrenzten T-Zellrezeptor Repertoires, ist all dies dennoch nicht die Voraussetzung für die Aktivierung und Induktion spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen. Die dadurch vorherrschende Hierarchie einzelner Epitope macht eine Unterscheidung zwischen immundominanten und immunrezessiven Epitopen möglich, wobei effiziente T-Zellantworten gegen immundominante Epitope, eine Immunantwort gegen immunrezessiven Epitope, unterdrücken können. Sowohl das murine V3-spezifische ZTL Epitop R10I^{V3/III_B} (H-2D^d) als auch das p24-spezifische Epitop A9I^{p24/1} (H-2K^d) sind als immundominante Epitope bekannt (Takahashi *et al.* 1988, Sastry *et al.*, 1992; Selby *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *in vivo* Expression der jeweiligen immundominanten Epitope, A9I^{p24/1} und R10I^{V3/III_B}, in beiden Fällen eine isolierte, Epitop-spezifische CD8⁺-zytotoxische T-Zellantwort *in vivo* induziert. Dabei scheint das V3-spezifische Epitop gegenüber dem p24-spezifischen Epitop immunogener zu sein. Befinden sich die genannten Epitope allerdings im Kontext des Pr55^{gag}V3 Proteins, so ist die *in vivo* induzierte ZTL-Antwort gegen das p24-spezifische A9I^{p24/1} Epitop effizienter als gegen das V3-spezifische Epitop R10I^{V3/III_B}. Diese Ergebnis läßt vermuten, daß das V3-spezifische Peptid R10I^{V3/III_B}, trotz erhöhter Immunogenität, wesentlich ineffizienter proteolytisch generiert wird, als das p24-spezifische Peptid A9I^{p24/1}. Im Gegensatz dazu konnte gegen das zweite p24-spezifische Epitop E10F^{p24/1} nur durch *in vivo* Expression des komplexen Antigens eine effiziente, dennoch im Vergleich mit dem A9I^{p24/1}-Peptid reduzierte, ZTL-spezifische Immunantwort induziert werden. Seit langem ist bekannt, daß die Induktion einer effizienten CD8⁺ zytotoxischer T-Zellantwort von der Hilfe CD4⁺ T-Zellen abhängt (Bennett *et al.*, 1997; Reimann und Schirmbeck, 1999). Dennoch scheint aufgrund der dargestellten Ergebnisse zumindest für immundominante Epitope, eine T_H-unabhängige Induktion CD8⁺ zytotoxischer T-Zellantworten möglich zu sein. Interessanterweise, wurden innerhalb des um einige Aminosäuren erweiterten R10I^{V3/III_B}-Peptids bzw. E10F^{p24/1}-Peptids ebenfalls T_H-Epitope nachgewiesen (Takahashi *et al.*, 1990, Nakamura *et al.*, 1997), so daß zumindest für vereinzelte ZTL-Epitope eine gleichzeitige Induktion CD4⁺-T_H Zellen denkbar wäre. Weiterhin könnte das abgespaltenen adenovirale Signalpeptid, oder das ebenfalls *in vivo* exprimierte Resistenzantibiotika Neomycin eine mögliche Quelle wichtiger T_H-Epitope sein. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Impfstoffen gegen regulatorische und toxische Genprodukte viraler und bakterieller Virulenzfaktoren, würden multivalente Minigene einen großen Sicherheitsvorteil bieten. Ferner könnte durch die Ko-Verabreichung monovalenter Minigene oder durch gezielte „Prime/Boost“-Verfahren mit rVVs oder Proteinantigenen, gezielt CD8⁺-spezifische Immunreaktionen gegen ausgewählte, immunogene MHC-Klasse I restringierte Epitope induziert bzw. erhöht werden (Hanke und McMichael, 1999; Hanke *et al.* 1999).

D.3.3 Entwicklung einer CD8⁺ T-Zell DNA-Vakzine: Optimierung der MHC-Klasse I Präsentation durch Modulation der Antigene

Die Eliminierung infizierter Zellen durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen verringert nachweislich die Viruslast *in vivo*. Aus diesem Grund ist bei der Entwicklung eines effizienten HIV/AIDS-Impfstoffes insbesondere die Induktion Antigen-spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen von Bedeutung (Schmitz *et al.*, 1999; Quiros *et al.*, 2000, Severino *et al.*, 2000). Die Induktion spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen erfolgt über die „Erkennung“ antigenen Peptide komplexiert mit MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen durch den T-Zellrezeptor (TCR) und das CD8 Molekül. Ko-stimulatorische Interaktionen zwischen weiteren Membranproteinen, wie z.B. CD2/LFA-3; LFA-1/ICAM-1 stimulieren die ZTL-Aktivität. I.d.R. werden die präsentierten Peptide durch proteasomale Degradation intrazellulärer viraler oder bakterieller Antigene generiert und komplexieren nach dem TAP-abhängigem Transport in das Endoplasmatische Retikulum mit den MHC-Klasse I Molekülen (zur Übersicht: Rock und Golberg, 1999; Yewdell und Bennink, 1999).

Einige Arbeitsgruppen konnten bereits im murinem Tiermodell zeigen, daß durch eine Antigen-spezifische Erhöhung intrazellulärer Degradationsprozesse, die CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort aufgrund einer gesteigerten MHC-Klasse I Präsentation, signifikant erhöht werden kann, während gleichzeitig eine Reduktion der humoralen Immunantwort beobachtet wurde. Zu diesem Zweck wurden Expressionsvektoren bzw. rekombinante Vakzinia Viren (rVV) generiert, welche für verschiedene Ubiquitin/Antigen-Fusionsproteine kodierte. Dabei wurde sowohl durch die Inhibition der Ubiquitin-Abspaltung (z.B. GA/XX) (zur Übersicht: Hershko und Ciechanover, 1998; Bonifacio und Weissman, 1998, Hochstrasser, 1996), als auch aufgrund der Exposition einer N-terminalen destabilisierenden Aminosäure, wie z.B. Arginin (Bachmeir *et al.*, 1986; Varshavsky *et al.*, 1987) nach Abspaltung des Ubiquitin Anteils (GG/R), eine drastische Verkürzung der Halbwertszeit der β -Galactosidase (Wung und Kipps, 1997), des LCMV („*lymphocytic choriomeningitis virus*“)-Nukleoproteins (Rodriguez *et al.*, 1997), des HIV-1 Nef Proteins (Toberx und Siliciano, 1997 und 1999) und des MPT56 Antigens von *Mycobacterium tuberculosis* (Delogu *et al.*, 2000), beobachtet. In den meisten Fällen konnte die Expression des jeweiligen, „destabilisierten“ Antigens ausschließlich in Anwesenheit von Inhibitoren der proteasomalen Degradation, wie z.B. Lactacystin und Calpain Inhibitoren I (ALLN) (Craiu *et al.*, 1997; Cerundolo *et al.*, 1997, Bai und Forman, 1997), nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings mittels der in der Literatur beschriebenen Modifikationen keine Reduktion der Halbwertszeit des HI-virale 55kDa Gag Proteins erzielt. In der Literatur existieren bislang zwei weitere Beispiele, bei denen die genannten Modifikationen des Nukleoproteins (NP) von Influenza (Fu *et al.*, 1998) bzw. dem Kapsidprotein von HCV (Vidalin *et al.*, 1999) ebenso keinen Einfluß auf die Degradation *in vitro* bzw. die Immunogenität *in vivo* besitzen. Da in den beschriebenen Fallbeispielen eine durchschnittliche Reduktion der Halbwertszeit auf <2-15min beschrieben wurde, die ermittelte Halbwertszeit des HIV-1 Gag Proteins allerdings, unabhängig von den Ubiquitin-Fusionen oder destabilisierenden N-terminalen Aminosäuren, >12-20h beträgt, kann gefolgert werden, daß das Gag Strukturprotein *in vivo* äußerst stabil ist und auf eine bislang unbekannte Weise einer Ubiquitin-abhängigen Degradation entgegenwirkt.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß das C-terminale PEST-Degron (Rogers *et al.* 1989) der murinen Ornithin-Decarboxylase (mODC), welches eine konstitutive, Ubiquitin-unabhängige Degradationssignal darstellt (Ghoda *et al.*, 1990; Loetscher *et al.*, 1991; Huibregtse *et al.*, 1995; Rechensteiner und Rogers, 1996, Hayashi und Murakami, 1995; Murakami *et al.*, 1992; Rosenberg-Hasson *et al.*, 1991), ein auf andere Proteine übertragbares Element darstellt,

und die Halbwertszeit ursprünglich stabiler Proteine, wie z.B. der ODC von *Trypanosoma brucei* (Ghoda et al., 1990), der Dehydrofolat-Reduktase DHFR (Loetscher et al., 1991) oder des EGFP („enhanced green fluorescence protein“) (Li et al., 1998) drastisch reduziert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch durch eine C-terminale Fusion des PEST-Degrone die Halbwertszeit oder die Stabilität des 55kDa Gag Proteins bzw. des 24kDa Kapsidproteins nicht signifikant reduziert wird. Im Zusammenhang mit den vorherigen Ergebnissen wird deutlich, daß die HI-viralen Strukturproteine, Gag und p24^{Ka}, in der Lage sind, sowohl der Ubiquitin-abhängigen als auch der Ubiquitin-unabhängigen Degradation durch das Proteasom entgegenzuwirken.

Falsch gefaltete, zelluläre Proteine werden nachweislich effizient degradiert. Dennoch konnte die Theorie, daß durch Einfügen möglicher, die Faltung und Integrität der HI-viralen Strukturproteine beeinflussender, singulärer Aminosäuremutationen, die Halbwertszeit des HI-viralen Strukturproteins Gag bzw. des Kapsidantigens reduziert wird, nicht bestätigt werden.

Trotz der hohen Stabilität der HI-viralen Strukturproteine, können sowohl in HIV-infizierten Patienten als auch im Tiermodell nach z.B. Immunisierung einer für das Gag-Polypeptid bzw. Kapsidprotein kodierenden Plasmid-DNA effiziente spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantworten *in vivo* generiert werden. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich die Theorie aufgestellt, daß die antigenen Peptide durch proteasomale Degradation fehlerhafter Nebenprodukte der Proteinbiosynthese (DRiPs; „defective ribosomal products“) generiert werden (Yewdell et al., 1996 und 2001). Infolgedessen wäre daher nicht die absolute Menge oder die Halbwertszeit des exprimierten Antigens zur Generierung immunogener Peptid/MHC-Klasse I Komplexe und infolge zur Induktion CD8⁺-zytotoxischer T Zellen von Bedeutung, sondern primär die Translationsrate der entsprechenden mRNA-Transkripte. DRiPs werden dabei als nicht-native Polypeptide oder Proteine definiert, die aufgrund einer fehlerhaften Translation, wie z.B. vorzeitiger Translationsabbruch (tDRiPs), oder fehlerhafter post-translationaler Modifikation, die z.B. für eine korrekte Faltung notwendig ist (mDRiPs), entstehen. Ferner konnte gezeigt werden, daß bei der Neu-Synthese von Proteinen mit einer Häufigkeit von 30% DRiPs entstehen (Schubert et al., 2000). Diese sind zum größten Teil ubiquitiniliert und dienen als Quelle antigenen Peptide. Dabei ist nicht ausgeschlossen, daß die Häufigkeit der Generierung von DRiPs durch endogene bzw. exogene Signale, wie z.B. Virusinfektionen oder inflammatorische Zytokine, zusätzlich noch gesteigert werden kann, um auf diese Weise eine effizientere CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort zu gewährleisten. Auch für das HI-virale Polypeptid Gag konnte die Generierung von ubiquitinilierten, p24-spezifischen hochmolekularen DRiPs (70-250 kDa) demonstriert werden (Schubert et al., 2000). Unklar bleibt in diesem Zusammenhang weiterhin, welche Rolle die durch die alternative, interne Translationsinitiation entstandene p40* Gag-Isoform bei der Generierung von DRiPs bzw. als Quelle antigenen Peptide spielt.

D.3.4 Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits ausführlich die Bedeutung einer optimalen Genexpression auf die Immunogenität *in vivo* diskutiert. Neben der Optimierung der Genexpression durch die Adaption des Kodongebrauchs an den von hochexprimierten Säugetiergenen, können auch noch andere cis-aktive Sequenzelemente des Vektors selbst, die Genexpression beeinflussen und optimieren (Hartikka et al., 1996). So ist eine effiziente Translationsinitiation von der Länge 5'-UTR Bereichs, der mRNA-Sekundärstruktur und u.a. von dem Vorhandensein einer die Ribosomenbindung gewährleistenden „Kozak“-Konsensus Sequenz (GCC GCC [^]/_CCC ATG) abhängig (Kozak et al. 1987). Auch das jeweilige Polyadenylierungssignal

(z.B. BGH („*bovine growth hormone*“), β -Globin) und die daraus resultierende Länge des Poly(A)-Schwanzes besitzt sowohl einen Einfluß auf die nukleäre und zytoplasmatische mRNA-Stabilität und die Translationseffizienz (Manley und Proudfoot, 1994; Colgan und Manley, 1997). Zusätzlich eingefügte Intronsequenzen (z.B. CMV Intron A, β -Globin Intron) *upstream* der kodierenden Sequenz oder bestimmte, virale Exportsignale (z.B. CTE, PRE) können u.U. den Export der RNA aus dem Zellkern und infolgedessen die Antigen Expression erhöhen (Chapman *et al.*, 1991; Huang 1990, Huang *et al.*, 1995, Wodrich *et al.* 2000). Die Wahl des Promotors bzw. der Enhancer-Elemente, welche die Genexpression auf transkriptioneller Ebene regulieren, ist dabei von besonderer Bedeutung. Gewöhnlich enthalten eukaryontische Expressionsvektoren und somit auch die gegenwärtig verwendeten DNA-Vakzine Vektoren virale Promotoren, wie z.B. den hCMV „*immediate early*“-Promotor („*human cytomegalie virus*“), den RSV-Promotor („*rous sarcoma virus*“) oder den SV40 Promotor („*simian virus 40*“). Diese erlauben eine überaus effiziente und konstitutive Antigen Expression in eukaryontischen Zellen (Foecking *et al.*, 1986). In den vergangenen Jahren wurde der Verdacht geäußert, daß eine infolge der DNA-Immunisierung, unkontrollierbare Zelltyp-unabhängige Überexpression von Antigenen, insbesondere im Zusammenhang mit den dabei induzierten Zytokinen, möglicherweise zu Organschädigungen oder Autoimmunreaktionen führen könnte (Bui *et al.*, 1997; Qin *et al.* 1997; Yokoyama *et al.* 1997). Zudem würde eine langanhaltende Expression die Wahrscheinlichkeit einer zunehmenden Attenuation und schließlich einer Immuntoleranz gegenüber den Fremdproteinen erhöhen (Klinman *et al.*, 1997; Mor und Eliza, 2001). Aufgrund dieser geäußerten Sicherheitsbedenken wäre die Verwendung regulierbarer, Zelltyp spezifischer Promotoren von Vorteil.

D.3.4.1 Die Immunogenität der pc-syngag DNA-Vakzine korreliert mit der Aktivität des Promotors

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß der zelluläre MCK-Promotor, welcher normalerweise die Genexpression des myogenen Enzyms Kreatinkinase reguliert, ausschließlich in ausdifferenzierten Skelletmuskelzellen (Myotuben) aktiv ist (Buskin *et al.* 1985; Chamberlain *et al.*, 1985; Jaynes *et al.*, 1986 und 1988; Johnston 1989; Shield *et al.* 1996). Allerdings ist die Genexpression im Vergleich zu dem konstitutivem, viralen CMV-Promotor um 50% reduziert. Obwohl beschrieben wurde, daß durch die Insertion des für die Spezifität der Genexpression hauptsächlich verantwortlichen E1-Enhancer Elements 250bp *upstream* des CMV-Promotors/Enhancers eine im Vergleich zum CMV Promotor, langanhaltende effiziente Genexpression nach Injektion transduzierter Muskelzellen induziert werden kann (Dai Y. *et al.*, 1992), konnte dies *in vivo* nicht bestätigt werden (Hartikka J. *et al.*, 1996). Ferner weist der MCK/CMV Hybridpromotor keine Muskelspezifität auf. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Einfluß des E1 Elements auf den basalen CMV-Promotor zu untersuchen. Nach Immunisierung der verschiedenen DNA-Vakzine Kandidaten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Immunogenität des *in vivo* exprimierten HI-viralen Antigens Gag im wesentlichen mit der Aktivität des jeweiligen Promotors korreliert. Dennoch induziert die Gag-spezifische myogene DNA-Vakzine sowohl eine detektierbare Antigen-spezifische humorale als auch eine zelluläre Immunantwort *in vivo*. Da in einer Studie demonstriert wurde, daß die mit einer entsprechenden, myogenen DNA-Vakzine immunisierten Versuchstiere vor einer genitalen HSV-2 Infektion geschützt waren, (Gebhard *et al.*, 2000) impliziert allerdings auf der anderen Seite, daß eine starke konstitutive Genexpression nicht unbedingt die Voraussetzung für die Induktion einer schützenden Immunantwort sein muß. Alternativ zum murinem MCK-Promotor, könnte z.B. der muskelspezifische jedoch differenzierungsunabhängige Desmin-Promotor verwendet werden, dessen Aktivität *in vitro* mit

dem CMV-Promotor vergleichbare ist (Li und Paulin, 1993, Loirat *et al.*, 1999, Naffakh *et al.*, 1996, Armand *et al.*, 2000, Kwissa *et al.* 2000). Die entsprechenden myogenen Antigen-spezifischen DNA-Vakzine Vektoren induzieren dabei eine mit dem CMV-Promotor vergleichbare humorale und zelluläre Immunantwort (Armand *et al.*, 2000; Kwissa *et al.* 2000; Loirat *et al.*, 1999).

D.3.4.2 Die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren ist abhängig von der Freisetzung des exprimierten Antigens *in vivo*

In allen bislang veröffentlichten Studien, in denen die Effektivität myogener DNA-Vakzine Vektoren untersucht wurde, kodierten die Plasmide für partikuläre Antigene, wie z.B. dem HBsAg (HBV), Sekretproteine oder exponierte Hüllproteine. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß unter Verwendung myogener Vektoren nur in den Fällen eine relativ effiziente Gag-spezifische humorale als auch zelluläre Immunantwort induziert wird, wenn das partikuläre oder das myristylierungsdefekte Gag Polyprotein, welches aufgrund von lysierten Zellen freigesetzt wird, exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte trotz effizienter Genexpression des zytoplasmatischen HI-viralen Kapsidproteins p24^{KA} in ausdifferenzierten Muskelzellen, lediglich eine schwache p24-spezifische Immunantwort *in vivo* detektiert werden. Diese Ergebnisse implizieren, daß, bei Verwendung myogener DNA-Vakzine Kandidaten, die Voraussetzung der Induktion Antigen-spezifischer Immunantworten eine Freisetzung des in Muskelzellen exprimierten Antigens z.B. durch Sekretion, Abschnürung von Lipoproteinpartikeln oder apoptotischer Prozesse und infolgedessen „Cross-Priming“-Effekte sind. Zudem scheint hierbei die allgemein anerkannte Theorie bestätigt zu werden, daß nach i.m. DNA-Immunisierung die Muskelzellen zwar effiziente Antigen-produzierende Zellen sind, jedoch nicht in der Lage sind, das Antigen MHC-Klasse I restringiert zu präsentieren und somit eine initiale Immunantwort zu induzieren (Ulmer *et al.*, 1996; Condor *et al.*, 1996).

D.3.4.3 IFN- γ reprimiert die Aktivität konstitutiver und zellulärer Promotoren

Die körpereigenen Abwehrmechanismen sind in der Lage, die virale Genexpression *in vivo* zu unterdrücken. So konnte z.B. gezeigt werden, daß die Aktivität einer Vielzahl viraler Promotoren durch das inflammatorische Zytokin IFN- γ , welches insbesondere nach DNA-Immunisierung Antigen-unspezifisch bzw. Antigen-spezifisch von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten sezerniert wird, inhibiert wird (Harms und Splitter 1995, Ghazizadeh *et al.* 1997, Qin *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß nicht nur die Aktivität des viralen CMV-Promtors, sondern auch die des zellulären MCK-Promtors bereits durch geringe Konzentrationen IFN- γ reduziert wird. Somit besitzt der zelluläre MCK-Promtors gegenüber dem CMV-Promotor, insbesondere im Hinblick auf eine langanhaltenden Genexpression *in vivo* keinen Vorteil.

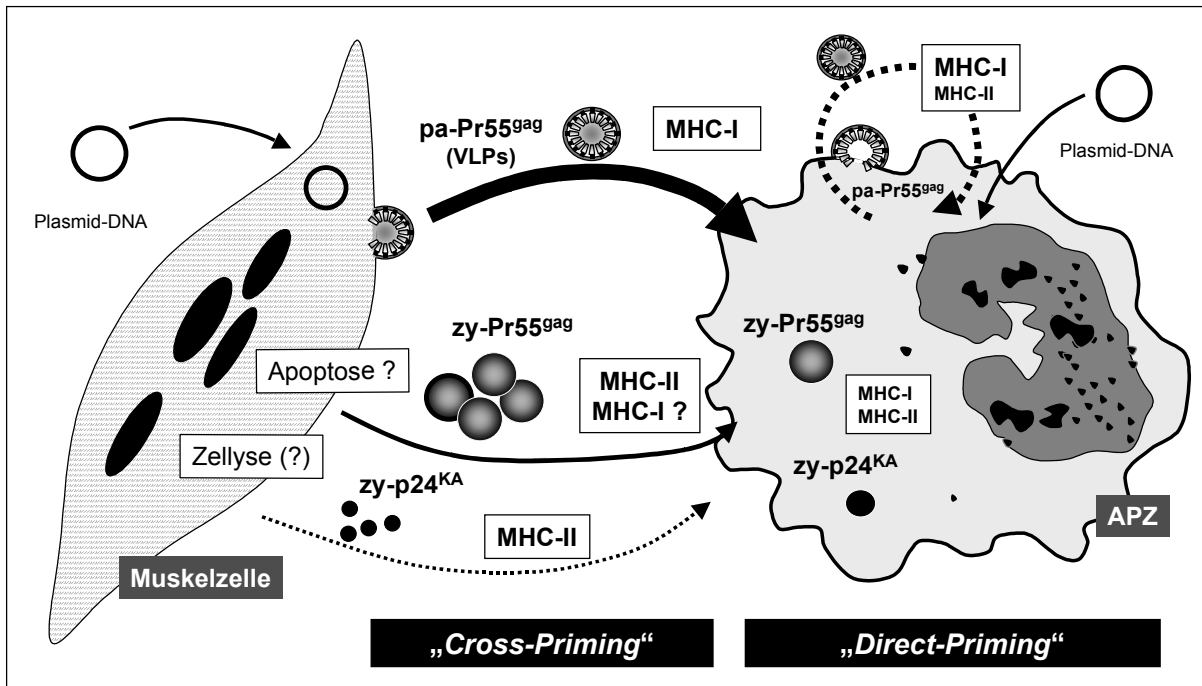


Abbildung D-5 Hypothetischer Mechanismus der Immuninduktion durch i.m. Immunisierung myogener DNA-Vakzine Vektoren. Lediglich diejenigen Antigene, die als partikuläre Antigene oder assoziiert mit apoptotischen Vesikel von der Muskelzelle freigesetzt werden sind in der Lage eine effiziente MHC-Klasse I restringierte Immunantwort zu induzieren. Eine basale Expression der Antigene in direkt transfizierten APZ führt vermutlich zur MHC-Klasse II restringierten Präsentation.

Dennoch stellen myogene DNA-Vakzine Vektoren im Vergleich zu herkömmlichen Vektoren „sicherere“ Vektorsysteme dar, die trotz einer allgemein reduzierten Expressionsrate durch Modifikation der Antigen Lokalisation in der Lage sein könnten, eine schützende Immunantwort *in vivo* zu induzieren. Alternativ zur Verwendung gewebspezifischer Promotoren, können die Plasmid-DNA Moleküle mit CTLA-5 fusioniert werden, wobei durch die Interaktion mit den Oberflächenmolekülen CD80 (B7-1) bzw. CD86 (B7-2) Antigen-präsentierender Zellen eine gezielte, zellspezifische Aufnahme der Plasmide und infolgedessen eine effiziente Induktion initialer Immunantworten gewährleistet wird (Deliyannis *et al.* 2000)

D.4 Entwicklung und Evaluierung neuer DNA-Vakzine Kandidaten gegen das HI-virale Tat Protein

D.4.1 Impfstoffe gegen toxische Antigene und Virulenzfaktoren

Viele Krankheitssymptome bakterieller Infektionen werden durch Toxine, wie z.B. dem Tetanospasmin (*Clostridium tetani*) und dem Diphtherietoxin (*Corynebacterium diphtheriae*), die vom Bakterium selbst sezerniert werden, verursacht. Auch während einer viralen Infektion werden regulatorische Proteine exprimiert, die entweder intrazellulär in verschiedene Stoffwechselprozesse der Wirtszelle störend eingreifen oder nach Sekretion bzw. Freisetzung auf andere Zellen einwirken. Eine Vielzahl viraler Proteine, wie z.B. ICP47 (HSV-1/2 „herpes simplex virus“), 19kDa-E3 (Adenovirus) oder US3 (hCMV; „human cytomegalie virus“), besitzen zudem immunmodulatorische Eigenschaften und reduzieren die Erkennung infizierter Zellen durch die Immunzellen. Aufgrund der toxischen Eigenschaften bakterieller Virulenzfaktoren erfolgt eine Impfung generell mit Toxoiden, d.h. mit z.B. durch Formalin chemisch inaktivierten Toxine. In den vergangenen Jahren wurde insbesondere im Rahmen der Entwicklung geeigneter HIV/AIDS-Impfstoffe deutlich, daß womöglich nur eine kombinatorische Vakzine, die gegen eine Vielzahl viraler Proteine und somit auch gegen die regulatorischen, HI-viralen Proteine, wie z.B. Rev, Nef und Tat, gerichtet ist und auf unterschiedliche Vakzine-Konzepten und Verabreichungsformen basiert, einen umfassenden Schutz vor HIV-Infektion induzieren könnte. Effiziente Vakzine-Konzepte, die gegen die früh im viralen Replikationszyklus exprimierten Proteine gerichtet sind, könnten so die HIV Replikation in einem frühem Stadium inhibieren und infolgedessen eine systemische Ausbreitung des Virus verhindern. Da allerdings die Verabreichung von entsprechenden Toxoiden verstärkt die humorale Immunantwort induziert, würden Virus-infizierte Zellen aufgrund der nur unzureichend induzierten zellulären Immunantwort nur ineffizient eliminiert werden. Somit wäre das eigentliche Ziel verfehlt. Die DNA-Vakzinierung sowie auch die Impfung mit rekombinanten viralen Vektoren (rVV, MVA), welche in der Lage sind, sowohl eine humorale als auch eine effiziente zelluläre Immunantwort zu induzieren, stellt diesbezüglich eine mögliche Alternative dar. Hierbei werden jedoch wiederum die Toxine bzw. Virulenzfaktoren in ihrer aktiven Form *in vivo* exprimiert. Aus diesem Grund müssen Strategien entwickelt werden, die es erlauben inaktive und dennoch immunogene Formen des jeweiligen Proteins *in vivo* zu exprimieren, um auf diese Weise insbesondere eine effiziente zelluläre Immunantwort zu induzieren.

D.4.2 Entwicklung effizienter DNA-Vakzine Kandidaten gegen das regulatorische HIV-1 Tat Protein

D.4.2.1 Die Bedeutung einer Tat-spezifischen Vakzine

Das HIV-spezifische, regulatorische und vorwiegend im Zellkern lokalisierte Protein Tat, welches bereits früh während des Replikationszyklus exprimiert wird, ist essentiell für die virale Genexpression (Fisher *et al.*, 1986; Dayton *et al.*, 1986, zur Übersicht: Karn, 1999). In den vergangenen Jahren verdichteten sich die Indizien, daß das HI-virale Tat Protein neben der Aktivierung der viralen, LTR-abhängigen Transkription auch andere, weitreichendere Funktionen besitzt (Huang *et al.* 1994, Jeang *et al.*, 1999). So gibt es Hinweise, daß Tat apoptotische Prozesse

in Lymphozyten induziert (Westendorp *et al.* 1995; Li *et al.*, 1995; McCloskey *et al.*, 1997) bzw. auch inhibiert (Gibellini *et al.* 1995), ruhende T-Zellen zur Proliferation anregt (Ott *et al.*, 1997), als Neurotoxin wirkt (Kolson *et al.*, 1994; Sabatier *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2000) und Funktionen besitzt, die Chemokinen (Albini *et al.*, 1998) bzw. Wachstumsfaktoren ähneln (Trinh *et al.*, 1999). Ferner induziert Tat die Expression einer Vielzahl von Zytokinen (Rautonen *et al.*, 1994), wie z.B. TNF α / β (Buonogaro *et al.*, 1992, Westendorp *et al.*, 1995), TGF α / β (Lotz *et al.* 1994; Nabell *et al.* 1994), IL-2 (Purvis *et al.*, 1992, Westendorp *et al.*, 1994), IL-6 (Scala *et al.*, 1994) und IL-8 (Mahieux *et al.*, 2001), und aktiviert bzw. interveniert zelluläre Signalkaskaden, an denen u.a. die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Milani D. *et al.* 1996 und 1998) oder NF- κ B (Biswas *et al.*, 1993; Manna und Aggarwal 2000; Ott *et al.*, 1998) beteiligt sind. Aufgrund dieser Vielzahl (immun)regulatorischer Eigenschaften steht das Tat Protein in einem engen Zusammenhang mit der HI-viralen Pathogenese und der mit der Infektion assoziierten Immunsuppression (Zagury *et al.*, 1998). So konnte z.B. gezeigt werden, daß Tat das Wachstum von Kaposi-ähnlichen Endothelzellen (KSC; „*Kaposi sarcoma spindle cell*“) stimuliert, und somit die Entstehung der HHV-8 („*human herpesvirus 8*“) assoziierten Kaposi-Sarkomen bei HIV-infizierten Patienten begünstigt (Ensoli *et al.* 1990; Barialli *et al.*, 1993; zur Übersicht. Ensoli *et al.*, 2001). Alle bislang bekannten Funktionen beruhen vorwiegend auf der Fähigkeit des überwiegend nukleär lokalisierten Tat Proteins, von den Zellen freigesetzt und auch extrazelluläre aktiv zu sein (Ensoli *et al.*, 1993). Obwohl bekannt ist, daß Tat nicht sezerniert wird, ist die Freisetzung aus intakten Zellen, welche durch Erhöhung der Temperatur (42°C) und unter serumfreien Bedingungen gesteigert werden kann, noch im Detail unklar (Chang *et al.*, 1997). An der Aufnahme des funktionsfähigen, extrazellulären Tat Proteins scheint vor allem das ubiquitäre Herparansulfat Proteoglykan Molekül (HSPG) beteiligt zu sein, welches mit der basischen Domäne des Tat Proteins (aa. 49-57) interagiert (Chang *et al.*, 1997; Tyagi *et al.*, 2001). Ferner ermöglicht eine Fusion dieser basischen Domäne mit anderen Proteinen eine effiziente Zelltyp-unabhängige Internalisierung und Transduktion von Zellen (Mann und Frankel, 1991; Fawell *et al.* 1994; Nagahara *et al.*, 1998; Vives, 1997; Schwarze *et al.*, 1999; Becker-Hapak *et al.*, 2001).

Verschiedene klinische Studien belegen, daß die Anwesenheit Tat-spezifischer Antikörper (Zagury *et al.*, 1998; Re *et al.*, 1995; Rodman *et al.*, 1993; Reiss *et al.* 1990) sowie Tat-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (van Baalen *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 1996) mit einem verlangsamten Krankheitsverlauf von HIV-infizierten Patienten korreliert. Zudem ist Tat innerhalb der für das humane System immundominanten Domänen (ID1: 5-22; ID2: 43-62) stark konserviert (Neuveut und Jeang, 1996, Goldstein, 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen würde eine Tat-spezifische HIV/AIDS-Vakzine eine wertvolle Komponente einer kombinatorischen, präventiven bzw. therapeutischen HIV/AIDS-Vakzine darstellen (Goldstein, 1996).

D.4.2.2 Optimierung der Tat Expression durch Adaption des Kodongebrauchs

Aufgrund des ermittelten Molekulargewichts des Tat Proteins (1-86aa.) kann eine zelltypunabhängige, post-translationale Modifikation, wie z.B. Acetylierungen (Kiernan *et al.*, 1999) oder Phosphorylierungen, *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie wurde das Tat Protein in HeLa Zellen ebenfalls als 16kDa Protein detektiert, jedoch wurde diese Beobachtung nicht diskutiert (Kjerrström *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß durch die Anpassung des Kodongebrauchs an der von hochexprimierten Säugetiergenen die Tat Expression in Abhängigkeit von zelltypspezifischen Faktoren deutlich erhöht wird. Während in den humanen Zellen die

Expression gegenüber der Wildtyp-kodierenden Gensequenz nur geringfügig ist, so ist dagegen die Tat Expression in den murinen Zelllinien 3T3 und C₂C₁₂ signifikant erhöht. Diese in murinen Zellen beobachtete reduzierte Expression der HI-viralen Wildtyp kodierenden Sequenz ist weder auf transkriptioneller und translationaler Ebene, noch auf Ebene des RNA-Exports begründet. Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß auch die Tat-spezifischen pre-mRNA Transkripte möglicherweise Sequenzelemente enthalten, die in murinen Zellen möglicherweise zu einer verstärkten nukleären Instabilität und Degradation der HI-viralen RNA-Spezies führen. Zu diesen Beobachtungen gibt es in der Literatur bislang keine weiteren Hinweise, da erstaunlicherweise die Expression aller bislang veröffentlichten Tat DNA-Vakzine Kandidaten lediglich in humanen Zellen oder Primatenzellen, nicht aber in murinen Zellen überprüft worden ist.

D.4.2.3 Die Kodon-Optimierung erhöht die Immunogenität der Tat-spezifischen DNA-Vakzine im Balb/c-Mausmodell

Durch die Optimierung des Kodongebrauchs und der damit verbundenen Erhöhung der Tat-spezifischen Expressionsrate in murinen Zellen, konnte auch demzufolge die humorale sowie zelluläre Tat-spezifische Immunantwort nach i.m. Immunisierung der entsprechenden synthetischen Tat-spezifischen DNA-Vakzine Kandidaten, gegenüber der Wildtyp Genkassette, signifikant erhöht werden. Dies war insbesondere bei geringen Konzentrationen immunisierter Plasmid DNA (20µg) zu beobachten. Auch in den bislang veröffentlichten murinen Immunisierungsstudien konnten trotz wiederholter Auffrischimpfungen und Vorbehandlung der Versuchstiere mit Myotoxinen lediglich geringe Tat-spezifische AK-Titer (1:400-1:2000) nachgewiesen werden (Kjerrström *et al.*, 2001, Caselli *et al.*, 1999). Im Vergleich dazu, werden nach einer 3-maligen Immunisierung einer entsprechenden pc-syntat DNA-Vakzine Tat-spezifische AK-Titer von durchschnittlich 1:10.000 induziert. Dennoch konnte wiederholt bestätigt werden, daß die durch DNA-Immunisierung einer Tat-spezifischen DNA-Vakzine induzierte humorale Immunantwort weitaus ineffizienter ist, als eine Immunisierung mit rekombinantem Tat Protein (Casell *et al.*, 1999; Kjerrström *et al.*, 2001). Inwieweit dies allerdings auch für die neuartige, synthetische pc-syntat DNA-Vakzine gilt, die zudem auch eine erhöhte zelluläre Immunantwort induziert, wurde gegenwärtig noch nicht untersucht.

D.4.2.4 B-Zell Epitope und neutralisierende Eigenschaften der Antikörper

Die bislang dokumentierten Tat-spezifischen B-Zell Epitope wurden innerhalb der Cysteinreichen (20-40aa.) (Caselli *et al.*, 1999) bzw. zentralen Region (31-50aa.) (Kjerrström *et al.*, 2001; Hinkula *et al.* 1997) des Tat Proteins detektiert, obwohl nach Immunisierung mit Protein, die murinen B-Zell Epitope innerhalb des N-terminalen (1-20aa.) (Dingwall *et al.*, 1989; Mhashikar *et al.*, 1995; Valvatne *et al.* 1996; Caselli *et al.* 1999) bzw. des C-terminalen Bereichs (72-86aa.) (Dingwall *et al.* 1989; Brake *et al.* 1990) identifiziert wurden. Diese Ergebnissen implizieren, daß möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen der Immuninduktion die durch DNA,- bzw. Protein-Immunisierung induzierten AK gegen unterschiedliche Epitope oder gegen gleiche Epitope mit unterschiedlicher Effizienz gerichtet sind (Casell *et al.*, 1999). Ferner besitzen die durch DNA-Immunisierung induzierten Tat-spezifischen Antikörper nur zu 50%, die durch das Tat Protein induzierten AK zu 100% neutralisierende Eigenschaften (Casell *et al.*, 1999). Ob die neutralisierenden Eigenschaften der AK mit dem absolutem AK-Titer oder aber mit der Immunisierungsart (DNA versus Protein) im Zusammenhang stehen ist allerdings bislang unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen trotz Verwendung der Tat_{LAI}-spezifischen Peptide, die B-Zell Epitope vorwiegend in der N-terminalen (1-20aa.) und, in Abhängigkeit der absoluten AK-

Titer, ebenso in der zentralen Region (41-70aa.) detektiert werden. Tat-spezifische Antikörper, die eben gegen diese linearen Epitope (1-20aa.; 41-70aa.) gerichtet sind, sind nachweislich in der Lage, die transaktivierenden Eigenschaften des nativen Tat Protein neutralisierten (Brake *et al.* 1990, Valvatne *et al.*, 1996). Es liegt daher nahe, daß durch die Anpassung des Kodongebrauchs und der damit verbundenen Erhöhung der induzierten Tat-spezifischen Ak-Titer *in vivo* ebenso effiziente, und neutralisierende AK induziert werden können als durch die Immunisierung mit Tat Protein.

D.4.2.5 Erhöhung der Sicherheit durch das „*Scrambling*“ des *tat* Gens

Aufgrund der bereits dargestellten immunmodulatorischen Eigenschaften des nativen Tat Proteins ist eine Inaktivierung des Proteins für die Anwendung im Menschen dringend erforderlich (Cohen *et al.*, 1999). Daher lag in den vergangenen Jahren der Schwerpunkt bei der Entwicklung eines potentiellen Tat-Vakzine Kandidaten auf der Generierung eines chemisch, durch Carboxy-Methylierung (Frankel *et al.*, 1988) inaktivierten Tat Toxoids (zur Übersicht: Gallo *et al.* 1999). Das Tat Toxoid ist im Vergleich zum nativem Tat Protein äußerst stabil und induziert in verschiedenen Tiermodellen, wie z.B. in Mäusen und Kaninchen (Le Buanec *et al.*, 1998) sowie Makaken (Pauza *et al.*, 1999 und 2000), vergleichbare Tat-spezifische AK-Titer. Die Ergebnisse der ersten humanen klinischen Studien in seropositiven sowie seronegativen Patienten bestätigen die Sicherheit des Tat Toxoids und die Induktion Tat-spezifischer AK (1:16.000-1:64.000), welche bis zu einem Jahr nach Vakzinierung nachweisbar sind (Gringeri *et al.*, 1998 und 1999). Dennoch könnte durch alternative Immunisierungsmethoden, wie z.B. der DNA-Immunisierung oder rekombinanter viraler Vektoren (Osterhaus *et al.*, 1999) eine effizientere zelluläre Immunantwort induziert werden, die in der Lage wäre virusinfizierte Zellen frühzeitig zu eliminieren. Eine gegenwärtige Tat-spezifische DNA-Vakzine, die bislang nur im murinem Tiermodell untersucht wurde, besitzt singuläre Aminosäuresubstitutionen (Cys₂₂→Gly₂₂; Cys₂₂/Cys₃₇→Gly₂₂/Ser₃₇) innerhalb der stark konservierten Cystein-reichen Domäne des Tat-Proteins. Dabei konnte gezeigt werden, daß die mutierten ebenfalls extrazellulär vorliegenden Tat Proteine, welche nicht nur biologisch inaktiv sind, sondern auch trans-dominant negativ auf natives Tat Protein wirken (Betti *et al.*, 2001) und vergleichbare immunologische Eigenschaften besitzen wie das entsprechend *in vivo* expimierte, native Tat Protein (Caselli *et al.*, 1999). Allerdings wurde erst kürzlich ein murines ZTL-Epitop identifiziert (17-25aa.) (Morris *et al.*, 2002), welches allerdings aufgrund der genannten das Tat Protein inaktivierenden Mutationen, ebenfalls zerstört wurde. Dies zeigt deutlich, daß durch gezielte Mutationen auch mögliche immunologisch bedeutende Epitope zerstört werden könnten und diese Strategien somit nicht immer sinnvoll sind. In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine neuartige Methode, die auf einer partieller Fragmentierung des Proteins und anschließender Neuordnung der Peptide beruht, ein Gen generiert, welches für ein inaktiviertes, synthetisches „*Scrambled*“-Tat Protein kodiert.

D.4.2.5.1 Das „*Scrambled*“ Tat Protein ist biologisch inaktiv

Hierbei konnte gezeigt werden, daß das ca. 18kDa umfassende Protein von zell,- und gewebsspezifischen Faktoren unabhängig exprimiert wird, und aufgrund zweier erhalten gebliebener Kernlokalisierungssequenzen (GRKKR) (Ruben S. *et al.*, 1989) im Zellkern lokalisiert ist. Allerdings ist dessen Lokalisierung im Gegensatz zum Wildtyp Tat Protein ausschließlich nukleär und war zudem auf distinkte bislang unbekannte Kompartimente beschränkt. Obwohl diese Kompartimentierung bislang nicht im Detail untersucht wurde, könnte es sich dabei vermutlich um Nukleoli handeln. Der Befund, daß das „*Scrambled*“-Tat Protein nicht im

Zytoplasma lokalisiert ist, läßt vermuten, daß es nicht von der Zelle freigesetzt werden kann. Zur weiteren Überprüfung müßten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zum Wildtyp-Tat Protein das „Scrambled“-Tat Protein seine transaktivierenden Eigenschaften verloren hat. Somit kann davon ausgegangen werden, daß dieses artifizielle Protein nicht mehr funktionsfähig ist und durch das Herstellungsverfahren inaktiviert wurde.

D.4.2.5.2 Die „Scrambled“-Tat DNA-Vakzine induziert eine effiziente Wildtyp Tat-spezifische, zelluläre Immunantwort *in vivo*

Obwohl die ursprüngliche Aminosäuresequenz umstrukturiert wurde und dadurch die biologischen Eigenschaften des „Scrambled“-Tat Proteins inaktiviert wurden, induziert das nach DNA-Immunisierung *in vivo* exprimierte Protein eine effiziente Wildtyp Tat-spezifische zelluläre Immunantwort, die vergleichbar ist, mit der, welche durch die Immunisierung des Kodon-optimierten Tat-spezifischen DNA-Plasmids induziert wurde.

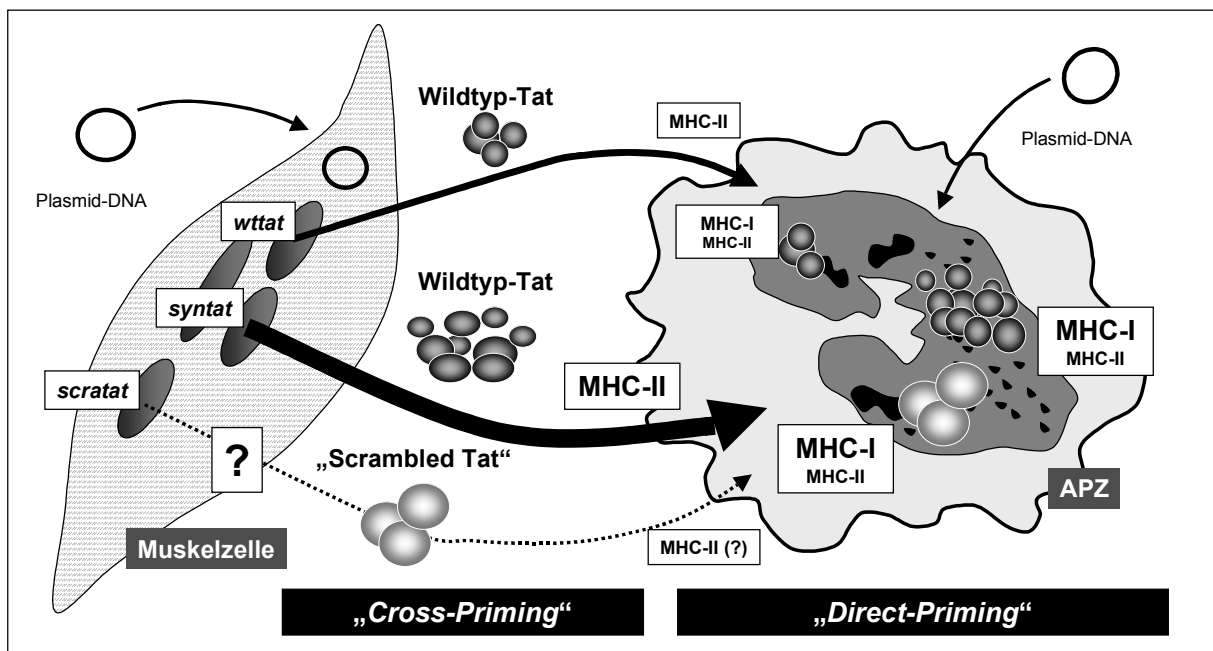


Abbildung D-6 Hypothetisches Mechanismus der Immuninduktion durch i.m. Immunisierung verschiedener, Tat-spezifischer DNA-Vakzine Kandidaten. Die effiziente Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort nach DNA-Immunisierung des Kodon-optimierten *pc-syntat* Expressionskonstrukts gegenüber dem *pc-wtat* Vektors wird vermutlich allein durch die Erhöhung der Expressionsrate *in vivo* bedingt. Die *in vivo* Expression des „Scrambled“ Tat Proteins induziert vornehmlich eine effiziente *wtat*-spezifische, zelluläre Immunantwort, so daß wahrscheinlich die Immuninduktion durch direkt transfizierte APZ eine größere Rolle spielen als „Cross-Priming“-Effekte. Ferner wird möglicherweise entweder das „Scrambled“ Tat Protein von den Muskelzellen nur unzureichend freigesetzt, oder die *wtat*-spezifischen B-Zell Epitope wurden, im Gegensatz zu den T-Zell Epitopen, durch das Herstellungsverfahren zerstört.

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß, in ähnlicher Weise wie bei multivalenten Minigenen, ursprüngliche Tat-spezifische T-Zellepitope aufgrund ihrer natürlichen flankierenden Aminosäuresequenzen proteasomal prozessiert und MHC-Klasse I restringiert auf der Oberfläche von APZ präsentiert werden können. In diesem Zusammenhang konnte weiterhin gezeigt werden, daß in beiden Fällen die Antigen-spezifischen, zellulären Immunreaktionen gegen den zentralen Bereich (31-60aa.) gerichtet sind. Diese Region (31-50aa.) ist bereits als murines, T-Zell spezifisches Epitop identifiziert (Hinkula *et al.*, 1997; Kjerrström *et al.*, 2001). Bislang war unbekannt, ob speziell im murinem Tiermodell, Tat-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen

induziert werden können. Mit der kürzlichen Identifizierung eines murinen HIV_{III_B}-spezifischen ZTL-Epitops (¹⁷QPKTACTNC²⁵) (Morris *et al.* 2001) könnten nun des weiteren die durch DNA-Immunisierung induzierten „Scrambled“-Tat spezifischen, zellulären Immunantworten detailliert untersucht werden. Trotz effizienter zellulärer Immunreaktionen, ist die durch i.m. DNA-Immunisierung des „Scrambled“-Tat Vektors induzierte humorale Immunantwort ausgesprochen ineffizient.

D.4.3 Die Tat-spezifische DNA-Vakzine als Komponente eines kombinierten HIV/AIDS-Vakzine Konzepts

Da lediglich in einem Fallbeispiel gezeigt werden konnte, daß die wiederholte Immunisierung von Cynomolgus Affen (*Macaca fascicularis*) mit Tat Protein und die Induktion Tat-spezifischer AK-Titer (1:10.000) einen Schutz gegen das pathogene, aber für diese Affenart nicht geeigneten Impfvirus SHIV_{89,6P} induziert (Cafaro *et al.*, 1999), wird eine Tat-spezifische Vakzine lediglich eine Komponente einer kombinatorischen HIV/AIDS-Vakzine sein. Mit Hilfe der in dieser Arbeit erstmals vorgestellten Methode wurde eine Tat-spezifische DNA-Vakzine entwickelt, welche zelltypunabhängig ein biologisch, inaktives „Scrambled“-Tat Protein exprimiert und eine effiziente sowie Wildtyp-Tat-spezifische, zelluläre Immunantwort *in vivo* induziert. Durch ein „DNA-Prime/Protein-Boost“ Verfahren mit dem chemisch inaktiviertem Tat Toxoid (Gallo *et al.* 1999) könnten zudem effiziente Tat-spezifische und neutralisierende AK-Titer generiert werden. Das „Scrambled“ tat Gen könnte weiterhin in attenuierte virale oder bakterielle Vektoren integriert werden, um auf diese Weise die Immunogenität zusätzlich zu steigern.

D.5 Ausblick: HIV/AIDS-Vakzine 2002

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl grundlegende Mechanismen der DNA-Immunisierung sowie Strategien der Immunmodulation im Balb/c-Mausmodell, am Beispiel des HI-viralen Strukturproteins Gag und des Regulatorproteins Tat, erörtert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse tragen wesentlich zur Optimierung herkömmlicher Vakzine-Vektoren bei. Insbesondere die Kodon-optimierten Genkassetten verschiedener HI-viraler Proteine, wie z.B. Gagpol und Env, die zusätzlich integrierte „Scrambled“-Gene der regulatorischen, inaktivierten Proteine Nef und Protease, die sowohl auf Basis des HI-virale Prototyp B Isolats (Graf *et al.*, 2000) und einem in China repräsentativem C-Typ Isolats (Su *et al.* 2000) entwickelt wurden, stellen bereits jetzt potentielle HIV/AIDS-Vakzine Kandidaten der 2.Generation dar. Diese, in unserer Arbeitsgruppe zum gegenwärtigen Zeitpunkt detailliert in prä-klinischen Studien im Makaken-Tiermodell evaluierten DNA-Vakzine Vektoren (K.Bieler, Dissertation 2002, IMMH Regensburg) sind, in Kombination mit anderen Immunisierungsstrategien, die in Kooperation mit weiteren europäischen, wissenschaftlichen sowie industriellen Partnern entwickelt und produziert werden, für humane klinische Studien der Phase I/II in Europa und China geplant. Kodon-optimierte DNA-Vakzine Vektoren befinden sich bereits seit 2001 in einer klinische Studien der Phase I (H.Robinson, Emory Univ./HVTN „HIV-1 vaccine trial network“). Auch weitere humane Studien, wie z.B. für DNA-Mikropartikel (Chiron/HVTN) oder DNA-Immunisierung in Kombination mit immunstimulatorischen Zytokinen (Wyeth Lederle/HVTN; Singh *et al.*, 2000) werden im Jahr 2002 initiiert werden. Nach vorherrschender Meinung wird die DNA-Vakzine dabei lediglich eine von zahlreichen Komponenten einer möglichen HIV/AIDS-Impfstoffes sein, da nur auf diese Weise eine Isolat-übergreifende, schützende Immunantwort im Menschen erzielt werden kann. Bereits im Jahr 2002 werden die ersten klinischen Studien der Phase II/III mit kombinierten Impfstoffe, darunter auch synthetische DNA-Vakzine Kandidaten, in ausgewählten Populationen initiiert. Dennoch werden mindestens zwei weitere Jahre vergehen, bis die ersten Daten vorliegen.

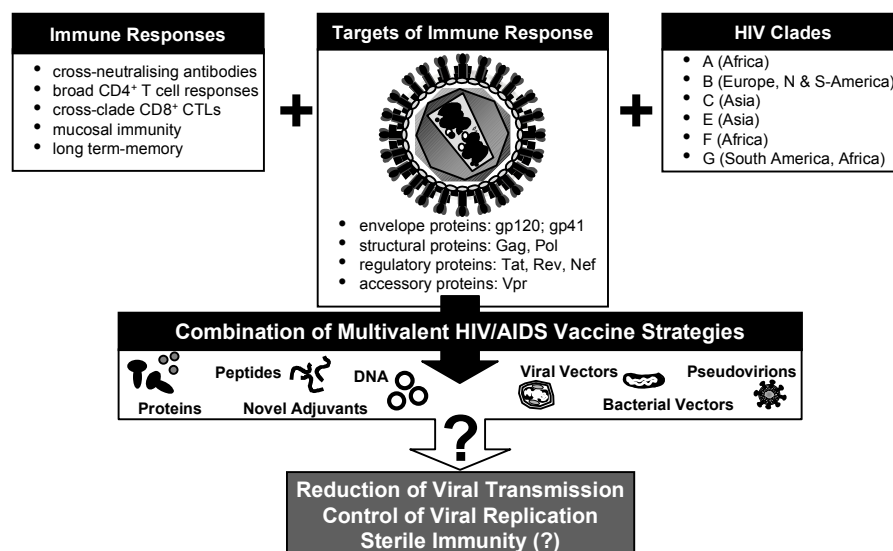


Abbildung D-7 Schematische Übersicht über mögliche Korrelate zur Induktion einer schützenden Immunantwort vor HIV-1 Infektion. Nach vorherrschender Meinung könnte nur die Induktion effizient neutralisierender Antikörper, langanhaltender zellulärer Immunreaktionen und einer mukosalen Immunantwort gegen möglichst konservierte Regionen einer Vielzahl viraler Antigen (Hüllproteine, Strukturproteine und regulatorische Proteine) von verschiedenen Virusisolaten eine Reduktion der Übertragung, die Kontrolle der Virusreplikation und möglicherweise eine sterile Immunität induzieren. Diese vielfältigen Immuninduktionen könnten nur durch die Kombination unterschiedlicher HIV/AIDS-Vakzine Kandidaten sowie verschiedener Immunisierungsstrategien (vgl. A.4) erreicht werden.

E Literaturverzeichnis

- Adams SE, Burns NR, Layton GT, Kingsman AJ. Hybrid Ty virus-like particles. *Int Rev Immunol*. 1994;11(2):133-41. Review.
- Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL, Berzofsky JA. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3947-58.
- Ahlers JD, Pendleton CD, Dunlop N, Minassian A, Nara PL, Berzofsky JA. Construction of an HIV-1 peptide vaccine containing a multideterminant helper peptide linked to a V3 loop peptide 18 inducing strong neutralizing antibody responses in mice of multiple MHC haplotypes after two immunizations. *J Immunol*. 1993 Jun 15;150(12):5647-65.
- Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA. Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10856-61.
- Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med*. 1999 Jan 4;189(1):169-78.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):86-9.
- Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13153-8.
- Alexander L, Lu HH, Gromeier M, Wimmer E. Dicitronic polioviruses as expression vectors for foreign genes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10 Suppl 2:S57-60.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.
- Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, Mothe BR, Steffen S, Boyson JE, Shipley T, Fuller J, Hanke T, Sette A, Altman JD, Moss B, McMichael AJ, Watkins DI. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol*. 2000 May 1;164(9):4968-78.
- Aloia RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 1;90(11):5181-5.
- Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 2001 Apr 6;292(5514):69-74.
- An LL, Rodriguez F, Harkins S, Zhang J, Whitton JL. Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine*. 2000 Apr 14;18(20):2132-41.
- An LL, Whitton JL. Multivalent minigene vaccines against infectious disease. *Curr Opin Mol Ther*. 1999 Feb;1(1):16-21. Review.
- Andersson S, Makitalo B, Thorstensson R, Franchini G, Tartaglia J, Limbach K, Paoletti E, Putkonen P, Biberfeld G. Immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 2 recombinant canarypox (ALVAC) vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *J Infect Dis*. 1996 Nov;174(5):977-85.
- Armand MA, Grange MP, Paulin D, Desgranges C. Targeted expression of HTLV-I envelope proteins in muscle by DNA immunization of mice. *Vaccine*. 2000 Apr 28;18(21):2212-22.
- Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1935-8.
- Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33414-22.
- Baba TW, Jeong YS, Pennick D, Bronson R, Greene MF, Ruprecht RM. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1820-5.
- Baba TW, Trichel AM, An L, Liska V, Martin LN, Murphey-Corb M, Ruprecht RM. Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1486-9.
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*. 1986 Oct 10;234(4773):179-86.
- Bachmair A, Varshavsky A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*. 1989 Mar 24;56(6):1019-32.
- Bacik I, Snyder HL, Anton LC, Russ G, Chen W, Bennink JR, Urge L, Otvos L, Dudkowska B, Eisenlohr L, Yewdell JW. Introduction of a glycosylation site into a secreted protein provides evidence for an alternative antigen processing pathway: transport of precursors of major histocompatibility complex class I-restricted peptides from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Exp Med*. 1997 Aug 18;186(4):479-87.
- Bai A, Forman J. The effect of the proteasome inhibitor lactacystin on the presentation of transporter associated with antigen processing (TAP)-dependent and TAP-independent peptide epitopes by class I molecules. *J Immunol*. 1997 Sep 1;159(5):2139-46.

- Barat C, Schatz O, Le Grice S, Darlix JL. Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *J Mol Biol.* 1993 May 20;231(2):185-90.
- Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):7941-5.
- Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G, Sato A, Stranford SA, Fujimura SH, Christopherson C, Chang SY, Levy JA. Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3105-14.
- Barklis E, McDermott J, Wilkens S, Fuller S, Thompson D. Organization of HIV-1 capsid proteins on a lipid monolayer. *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7177-80.
- Barouch DH, Craiu A, Kuroda MJ, Schmitz JE, Zheng XX, Santra S, Frost JD, Krivulka GR, Lifton MA, Crabbs CL, Heidecker G, Perry HC, Davies ME, Xie H, Nickerson CE, Steenbeke TD, Lord CI, Montefiori DC, Strom TB, Shiver JW, Lewis MG, Letvin NL. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):4192-7.
- Barouch DH, Letvin NL. DNA vaccination for HIV-1 and SIV. *Intervirology.* 2000;43(4-6):282-7. Review.
- Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, Bilska M, Craiu A, Zheng XX, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Nickerson CE, Trigona WL, Punt K, Freed DC, Guan L, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG, Emini EA, Shiver JW, Letvin NL. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science.* 2000 Oct 20;290(5491):486-92.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- Bartlett JA, Wasserman SS, Hicks CB, Dodge RT, Weinhold KJ, Tacket CO, Ketter N, Wittek AE, Palker TJ, Haynes BF. Safety and immunogenicity of an HLA-based HIV envelope polyvalent synthetic peptide immunogen. DATRI 010 Study Group. Division of AIDS Treatment Research Initiative. *AIDS.* 1998 Jul 30;12(11):1291-300.
- Battiste JL, Tan R, Frankel AD, Williamson JR. Binding of an HIV Rev peptide to Rev responsive element RNA induces formation of purine-purine base pairs. *Biochemistry.* 1994 Mar 15;33(10):2741-7.
- Beale J. An attenuated vaccine for AIDS? *Lancet.* 1995 May 27;345(8961):1318-9. No abstract available.
- Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods.* 2001 Jul;24(3):247-56. Review.
- Beekman NJ, van Veelen PA, van Hall T, Neisig A, Sijts A, Camps M, Kloetzel PM, Neefjes JJ, Melief CJ, Ossendorp F. Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1898-905.
- Belshe RB, Clements ML, Dolin R, Graham BS, McElrath J, Gorse GJ, Schwartz D, Keefer MC, Wright P, Corey L, et al. Safety and immunogenicity of a fully glycosylated recombinant gp160 human immunodeficiency virus type 1 vaccine in subjects at low risk of infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group Network. *J Infect Dis.* 1993 Dec;168(6):1387-95.
- Belshe RB, Gorse GJ, Mulligan MJ, Evans TG, Keefer MC, Excler JL, Duliege AM, Tartaglia J, Cox WI, McNamara J, Hwang KL, Bradley A, Montefiori D, Weinhold KJ. Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS.* 1998 Dec 24;12(18):2407-15.
- Belshe RB, Stevens C, Gorse GJ, Buchbinder S, Weinhold K, Sheppard H, Stablein D, Self S, McNamara J, Frey S, Flores J, Excler JL, Klein M, Habib RE, Duliege AM, Harro C, Corey L, Keefer M, Mulligan M, Wright P, Celum C, Judson F, Mayer K, McKimran D, Marmor M, Woody G. Safety and immunogenicity of a canarypox-vectored human immunodeficiency virus Type 1 vaccine with or without gp120: a phase 2 study in higher- and lower-risk volunteers. *J Infect Dis.* 2001 May 1;183(9):1343-52.
- Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, Kelsall BL, Earl P, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1709-14.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med.* 1997 Jul 7;186(1):65-70.
- Berger J, Aepinus C, Dobrovnik M, Fleckenstein B, Hauber J, Bohnlein E. Mutational analysis of functional domains in the HIV-1 Rev trans-regulatory protein. *Virology.* 1991 Aug;183(2):630-5.
- Berggren RE, Wunderlich A, Ziegler E, Schleicher M, Duke RC, Looney D, Fang FC. HIV gp120-specific cell-mediated immune responses in mice after oral immunization with recombinant Salmonella. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 Dec 15;10(5):489-95.
- Berglund P, Quesada-Rolander M, Putkonen P, Biberfeld G, Thorstensson R, Liljestrom P. Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 Nov 20;13(17):1487-95.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB, Jeang KT. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell.* 1990 Aug 24;62(4):757-67.

- Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science*. 1998 Oct 23;282(5389):759-62.
- Berzofsky JA, Pendleton CD, Clerici M, Ahlers J, Lucey DR, Putney SD, Shearer GM. Construction of peptides encompassing multideterminant clusters of human immunodeficiency virus envelope to induce in vitro T cell responses in mice and humans of multiple MHC types. *J Clin Invest*. 1991 Sep;88(3):876-84.
- Berzofsky JA. Designing peptide vaccines to broaden recognition and enhance potency. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 May 31;754:161-8. No abstract available.
- Betti M, Voltan R, Marchisio M, Mantovani I, Boarini C, Nappi F, Ensoli B, Caputo A. Characterization of HIV-1 Tat proteins mutated in the transactivation domain for prophylactic and therapeutic application. *Vaccine*. 2001 May 14;19(25-26):3408-19.
- Betts MR, Krowka JF, Kepler TB, Davidian M, Christopherson C, Kwok S, Louie L, Eron J, Sheppard H, Frelinger JA. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Sep 1;15(13):1219-28.
- Bieniasz PD, Cullen BR. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J Virol*. 2000 Nov;74(21):9868-77.
- Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, Cullen BR. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J*. 1998 Dec 1;17(23):7056-65.
- Biswas DK, Ahlers CM, Dezube BJ, Pardee AB. Cooperative inhibition of NF-kappa B and Tat-induced superactivation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11044-8.
- Blazevic V, Ranki A, Mattinen S, Valle SL, Koskimies S, Jung G, Krohn KJ. Helper T-cell recognition of HIV-1 Tat synthetic peptides. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993 Aug;6(8):881-90.
- Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol*. 1992 Nov;66(11):6829-35.
- Bogerd HP, Fridell RA, Madore S, Cullen BR. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell*. 1995 Aug 11;82(3):485-94.
- Bohm W, Mertens T, Schirmbeck R, Reimann J. Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine*. 1998 May-Jun;16(9-10):949-54.
- Bohnlein S, Hauber J, Cullen BR. Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*. 1989 Jan;63(1):421-4.
- Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, Desgranges C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity*. 1998 Aug;9(2):277-87.
- Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:19-57. Review.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994 Sep;68(9):6103-10.
- Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy K, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J Infect Dis*. 2000 Feb;181(2):476-83.
- Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Refaeli Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med*. 1997 May;3(5):526-32.
- Boykins RA, Ardans JA, Wahl LM, Lal RB, Yamada KM, Dhawan S. Immunization with a novel HIV-1-Tat multiple-peptide conjugate induces effective immune response in mice. *Peptides*. 2000 Dec;21(12):1839-47.
- Boyle CM, Robinson HL. Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations. *DNA Cell Biol*. 2000 Mar;19(3):157-65.
- Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol*. 1996 Jun;70(6):3551-60.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. No abstract available.
- Brake DA, Goudsmit J, Krone WJ, Schammel P, Appleby N, Meloen RH, Debouck C. Characterization of murine monoclonal antibodies to the tat protein from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1990 Feb;64(2):962-5.
- Brand D, Lemiale F, Turbica I, Buzelay L, Brunet S, Barin F. Comparative analysis of humoral immune responses to HIV type 1 envelope glycoproteins in mice immunized with a DNA vaccine, recombinant Semliki Forest virus RNA, or recombinant Semliki Forest virus particles. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Oct 10;14(15):1369-77.
- Brand D, Mallet F, Truong C, Roingeard P, Goudeau A, Barin F. A simple procedure to generate chimeric Pr55gag virus-like particles expressing the principal neutralization domain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol Methods*. 1995 Feb;51(2-3):153-68.

- Brasseur R, Cornet B, Burny A, Vandenbranden M, Ruyschaert JM. Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1988 Apr;4(2):83-90.
- Braun IC, Rohrbach E, Schmitt C, Izaurralde E. TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *EMBO J*. 1999 Apr 1;18(7):1953-65.
- Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, Hammariskjold ML. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 15;91(4):1256-60.
- Brightly DW, Rosenberg M. A cis-acting repressive sequence that overlaps the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus type 1 regulates nuclear retention of env mRNAs independently of known splice signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8314-8.
- Brown PH, Tiley LS, Cullen BR. Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences. *J Virol*. 1991 Jun;65(6):3340-3.
- Browning J, Horner JW, Pettoello-Mantovani M, Raker C, Yurasov S, DePinho RA, Goldstein H. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14637-41.
- Brunette E, Stribling R, Debs R. Lipofection does not require the removal of serum. *Nucleic Acids Res*. 1992 Mar 11;20(5):1151.
- Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):523-7.
- Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol*. 2001 Jan;75(1):181-91.
- Bukovsky AA, Dorfman T, Weimann A, Gottlinger HG. Nef association with human protease. *J Virol*. 1997 Feb;71(2):1013-8.
- Bukrinsky M, Sharova N, Stevenson M. Human immunodeficiency virus type 1 2-LTR circles reside in a nucleoprotein complex which is different from the preintegration complex. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6863-5.
- Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, Bohan CA, Kao V, Morgan R, Gallo RC, Ensoli B. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol*. 1992 Dec;66(12):7159-67.
- Burnett MS, Wang N, Hofmann M, Barrie Kitto G. Potential live vaccines for HIV. *Vaccine*. 2000 Nov 22;19(7-8):735-42.
- Buseyne F, McChesney M, Porrot F, Kovarik S, Guy B, Riviere Y. Gag-specific cytotoxic T lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Gag epitopes are clustered in three regions of the p24gag protein. *J Virol*. 1993 Feb;67(2):694-702.
- Buseyne F, Riviere Y. HIV-specific CD8+ T-cell immune responses and viral replication. *AIDS*. 1993 Nov;7 Suppl 2:S81-5. Review.
- Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. 1990 Sep 28;249(4976):1555-8.
- Bushman FD, Miller MD. Tethering human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes to target DNA promotes integration at nearby sites. *J Virol*. 1997 Jan;71(1):458-64.
- Buskin JN, Hauschka SD. Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*. 1989 Jun;9(6):2627-40.
- Buskin JN, Jaynes JB, Chamberlain JS, Hauschka SD. The mouse muscle creatine kinase cDNA and deduced amino acid sequences: comparison to evolutionarily related enzymes. *J Mol Evol*. 1985;22(4):334-41.
- Cafaro A, Caputo A, Fracasso C, Maggiorella MT, Goletti D, Baroncelli S, Pace M, Sernicola L, Koanga-Mogtomo ML, Betti M, Borsetti A, Belli R, Akerblom L, Corrias F, Butto S, Heeney J, Verani P, Titti F, Ensoli B. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):643-50.
- Cafaro A, Titti F, Fracasso C, Maggiorella MT, Baroncelli S, Caputo A, Goletti D, Borsetti A, Pace M, Fanales-Belasio E, Ridolfi B, Negri DR, Sernicola L, Belli R, Corrias F, Macchia I, Leone P, Michelini Z, ten Haaf P, Butto S, Verani P, Ensoli B. Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine*. 2001 Apr 6;19(20-22):2862-77.
- Calarota SA, Kjerrstrom A, Islam KB, Wahren B. Gene combination raises broad human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Hum Gene Ther*. 2001 Sep 1;12(13):1623-37.
- Calarota SA, Kjerrstrom A, Islam KB, Wahren B. Gene combination raises broad human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Hum Gene Ther*. 2001 Sep 1;12(13):1623-37.
- Caley IJ, Betts MR, Davis NL, Swanstrom R, Frelinger JA, Johnston RE. Venezuelan equine encephalitis virus vectors expressing HIV-1 proteins: vector design strategies for improved vaccine efficacy. *Vaccine*. 1999 Aug 6;17(23-24):3124-35.
- Caley IJ, Betts MR, Irlbeck DM, Davis NL, Swanstrom R, Frelinger JA, Johnston RE. Humoral, mucosal, and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type 1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector. *J Virol*. 1997 Apr;71(4):3031-8.
- Camaur D, Trono D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol*. 1996 Sep;70(9):6106-11.
- Caputi M, Mayeda A, Krainer AR, Zahler AM. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *EMBO J*. 1999 Jul 15;18(14):4060-7.

- Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med*. 1997 Nov 3;186(9):1481-6.
- Caselli E, Betti M, Grossi MP, Balboni PG, Rossi C, Boarini C, Cafaro A, Barbanti-Brodano G, Ensoli B, Caputo A. DNA immunization with HIV-1 tat mutated in the trans activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type Tat. *J Immunol*. 1999 May 1;162(9):5631-8.
- Cerundolo V, Benham A, Braud V, Mukherjee S, Gould K, Macino B, Neefjes J, Townsend A. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol*. 1997 Jan;27(1):336-41.
- Chamberlain JS, Jaynes JB, Hauschka SD. Regulation of creatine kinase induction in differentiating mouse myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1985 Mar;5(3):484-92.
- Chang DD, Sharp PA. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell*. 1989 Dec 1;59(5):789-95.
- Chang HC, Samaniego F, Nair BC, Buonaguro L, Ensoli B. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS*. 1997 Oct;11(12):1421-31.
- Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1991 Jul 25;19(14):3979-86.
- Charpentier B, Stutz F, Rosbash M. A dynamic in vivo view of the HIV-I Rev-RRE interaction. *J Mol Biol*. 1997 Mar 14;266(5):950-62.
- Chattergoon MA, Kim JJ, Yang JS, Robinson TM, Lee DJ, Dentchev T, Wilson DM, Ayyavoo V, Weiner DB. Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat Biotechnol*. 2000 Sep;18(9):974-9.
- Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1998 Jun 15;160(12):5707-18.
- Cheingsong-Popov R, Callow D, Weber J, Holm-Hansen C, Constantine NT. Antibody to specific HIV-1 proteins in oral mucosal transudates. *Lancet*. 1993 Jun 26;341(8861):1659-60.
- Cho JH, Youn JW, Sung YC. Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):5549-57.
- Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):13193-7.
- Churcher MJ, Lamont C, Hamy F, Dingwall C, Green SM, Lowe AD, Butler JG, Gait MJ, Karn J. High affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem and amino acid residues flanking the basic region. *J Mol Biol*. 1993 Mar 5;230(1):90-110.
- Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem*. 1980 Aug 25;255(16):7525-8.
- Ciernik IF, Berzofsky JA, Carbone DP. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J Immunol*. 1996 Apr 1;156(7):2369-75.
- Cladera J, Martin I, O'Shea P. The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface. *EMBO J*. 2001 Jan 15;20(1-2):19-26.
- Clements-Mann ML, Weinhold K, Matthews TJ, Graham BS, Gorse GJ, Keefer MC, McElrath MJ, Corey L, Wright PF, Belshe R, Dolin R, Jackson S, Xu S, Fast P, Walker MC, Stablein D, Excler JL, Tartaglia J, Paoletti E, et al. Immune responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induced by canarypox expressing HIV-1MN gp120, HIV-1SF2 recombinant gp120, or both vaccines in seronegative adults. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*. 1998 May;177(5):1230-46.
- Clerici M, Salvi A, Trabattini D, Lo Caputo S, Semplici F, Biasin M, Ble C, Meacci F, Romeo C, Piconi S, Mazzotta F, Villa ML, Mazzoli S. A role for mucosal immunity in resistance to HIV infection. *Immunol Lett*. 1999 Mar;66(1-3):21-5.
- Clerici M, Shearer GM. Correlates of protection in HIV infection and the progression of HIV infection to AIDS. *Immunol Lett*. 1996 Jun;51(1-2):69-73.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.
- Cochrane AW, Jones KS, Beidas S, Dillon PJ, Skalka AM, Rosen CA. Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J Virol*. 1991 Oct;65(10):5305-13.
- Cohen SS, Li C, Ding L, Cao Y, Pardee AB, Shevach EM, Cohen DI. Pronounced acute immunosuppression in vivo mediated by HIV Tat challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10842-7.
- Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev*. 1997 Nov 1;11(21):2755-66. Review. No abstract available
- Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1122-8.
- Coney L, Wang B, Ugen KE, Boyer J, McCallus D, Srikantan V, Agadjanyan M, Pachuk CJ, Herold K, Merva M, et al. Facilitated DNA inoculation induces anti-HIV-1 immunity in vivo. *Vaccine*. 1994 Dec;12(16):1545-50. Review.
- Connor RI, Korber BT, Graham BS, Hahn BH, Ho DD, Walker BD, Neumann AU, Vermund SH, Mestecky J, Jackson S, Fenamore E, Cao Y, Gao F, Kalams S, Kunstman KJ, McDonald D, McWilliams N, Trkola A, Moore JP, Wolinsky SM. Immunological and

- virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J Virol.* 1998 Feb;72(2):1552-76.
- Corbet S, Muller-Trutwin MC, Versmisse P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, Brunak S, Martin P, Brun-Vezinet F, Simon F, Barre-Sinoussi F, Mauclet P. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):529-34.
- Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med.* 1996 Oct 1;184(4):1555-60.
- Cosson P. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* 1996 Nov 1;15(21):5783-8.
- Cousens L, Chien D, Ng P, Archangel P, Grandi G, Houghton M, Abrignani S. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol.* 2000 Aug;74(15):6885-92.
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem.* 1997 May 16;272(20):13437-45.
- Cranage MP, Whatmore AM, Sharpe SA, Cook N, Polyanskaya N, Leech S, Smith JD, Rud EW, Dennis MJ, Hall GA. Macaques infected with live attenuated SIVmac are protected against superinfection via the rectal mucosa. *Virology.* 1997 Mar 3;229(1):143-54.
- Cullen BR, Malim MH. The HIV-1 Rev protein: prototype of a novel class of eukaryotic post-transcriptional regulators. *Trends Biochem Sci.* 1991 Sep;16(9):346-50. Review.
- Cullen BR. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.* 1991 Jul;5(10):2361-8. Review.
- Cullen BR. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology.* 1998 Sep 30;249(2):203-10. Review.
- Dai Y, Roman M, Naviaux RK, Verma IM. Gene therapy via primary myoblasts: long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):10892-5.
- Daly TJ, Cook KS, Gray GS, Maione TE, Rusche JR. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature.* 1989 Dec 14;342(6251):816-9.
- Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science.* 1992 Dec 18;258(5090):1938-41.
- Danko I, Fritz JD, Latendresse JS, Herweijer H, Schultz E, Wolff JA. Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Hum Mol Genet.* 1993 Dec;2(12):2055-61.
- Danko I, Wolff JA. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine.* 1994 Dec;12(16):1499-502. Review.
- Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 1993 Dec;4(6):733-40.
- Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine.* 1996 Jun;14(9):910-5.
- Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet.* 1993 Nov;2(11):1847-51.
- Davis HL, Millan CL, Watkins SC. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Ther.* 1997 Mar;4(3):181-8.
- Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther.* 1995 Nov;6(11):1447-56.
- Davis HL. CpG motifs for optimization of DNA vaccines. *Dev Biol (Basel).* 2000;104:165-9.
- Davis HL. Intramuscular and intradermal injection of DNA vaccines in mice and primates. In: Lowrie D.B. and Whalen R.G. (eds.) *DNA vaccines-methods and protocols*, Humana Press Inc., New Jersey (2000): 71-77.
- Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell.* 1986 Mar 28;44(6):941-7.
- Dayton ET, Konings DA, Powell DM, Shapiro BA, Butini L, Maizel JV, Dayton AI. Extensive sequence-specific information throughout the CAR/RRE, the target sequence of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *J Virol.* 1992 Feb;66(2):1139-51.
- de Quiros JC, Shupert WL, McNeil AC, Gea-Banacloche JC, Flanagan M, Savage A, Martino L, Weiskopf EE, Imamichi H, Zhang YM, Adelsburger J, Stevens R, Murphy PM, Zimmerman PA, Hallahan CW, Davey RT Jr, Connors M. Resistance to replication of human immunodeficiency virus challenge in SCID-Hu mice engrafted with peripheral blood mononuclear cells of nonprogressors is mediated by CD8(+) T cells and associated with a proliferative response to p24 antigen. *J Virol.* 2000 Feb;74(4):2023-8.
- Decroly E, Benjannet S, Savaria D, Seidah NG. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* 1997 Mar 17;405(1):68-72.
- Del Val M, Schlicht HJ, Ruppert T, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell.* 1991 Sep 20;66(6):1145-53.
- Deliyannis G, Boyle JS, Brady JL, Brown LE, Lew AM. A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6676-80.

- Delogu G, Howard A, Collins FM, Morris SL. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3097-102.
- Deml L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, Wolf H, Wagner R. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of dna candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10991-1001.
- Deml L, Kratochwil G, Osterrieder N, Knuchel R, Wolf H, Wagner R. Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain. *Virology*. 1997 Aug 18;235(1):10-25.
- Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. Immunostimulatory CpG motifs trigger a T helper-1 immune response to human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) gp 160 envelope proteins. *Clin Chem Lab Med*. 1999 Mar;37(3):199-204.
- Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. Recombinant human immunodeficiency Pr55gag virus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic T-cells and neutralizing antibodies. *Virology*. 1997 Aug 18;235(1):26-39.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997 Jul 17;388(6639):296-300.
- Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA, Valerio R. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):6925-9.
- Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA, Valerio R. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):6925-9.
- Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8578-83.
- Doerfler W, Orend G, Schubbert R, Fechteler K, Heller H, Wilgenbus P, Schroer J. On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes: mechanism and consequences. *Gene*. 1995 May 19;157(1-2):241-5.
- Doerfler W. Uptake of foreign DNA by mammalian cells via the gastrointestinal tract in mice: methylation of foreign DNA--a cellular defense mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;197:209-24. Review. No abstract available.
- Dolin R, Graham BS, Greenberg SB, Tacket CO, Belshe RB, Midthun K, Clements ML, Gorse CJ, Horgan BW, Atmar RL, et al. The safety and immunogenicity of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) recombinant gp160 candidate vaccine in humans. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *Ann Intern Med*. 1991 Jan 15;114(2):119-27.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:617-48. Review.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1149-58.
- D'Souza MP, Mathieson BJ. Early phases of HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 Jan 1;12(1):1-9.
- Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2850-8.
- Durali D, Morvan J, Letourneur F, Schmitt D, Guegan N, Dalod M, Saragosti S, Sicard D, Levy JP, Gomard E. Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *J Virol*. 1998 May;72(5):3547-53.
- Dyhr-Mikkelsen H, Kjems J. Inefficient spliceosome assembly and abnormal branch site selection in splicing of an HIV-1 transcript in vitro. *J Biol Chem*. 1995 Oct 13;270(41):24060-6.
- Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):648-52.
- Egan MA, Pavlat WA, Tartaglia J, Paoletti E, Weinhold KJ, Clements ML, Siliciano RF. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env gene. *J Infect Dis*. 1995 Jun;171(6):1623-7.
- Eggers M, Boes-Fabian B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med*. 1995 Dec 1;182(6):1865-70.
- Eisenbraun MD, Fuller DH, Haynes JR. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol*. 1993 Nov;12(9):791-7.
- Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol*. 1991 Mar;28(3):287-94.
- Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*. 1990 May 3;345(6270):84-6.

- Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol.* 1993 Jan;67(1):277-87.
- Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Sturzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Arv.* 2001 Jul;37(10):1251-69. Review.
- Ernst RK, Bray M, Rekosh D, Hammariskjold ML. Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element. *RNA.* 1997 Feb;3(2):210-22.
- Evans DJ, McKeating J, Meredith JM, Burke KL, Katrak K, John A, Ferguson M, Minor PD, Weiss RA, Almond JW. An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature.* 1989 Jun 1;339(6223):385-8, 340.
- Evans TG, Keefer MC, Weinhold KJ, Wolff M, Montefiori D, Gorse GJ, Graham BS, McElrath MJ, Clements-Mann ML, Mulligan MJ, Fast P, Walker MC, Excler JL, Duliege AM, Tartaglia J. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):290-8.
- Facke M, Janetzko A, Shoeman RL, Krausslich HG. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1993 Aug;67(8):4972-80.
- Falk LA, Goldenthal KL, Esparza J, Aguado MT, Osmanov S, Ballou WR, Beddows S, Bhamarapravati N, Biberfeld G, Ferrari G, Hoft D, Honda M, Jackson A, Lu Y, Marchal G, McKinney J, Yamazaki S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin as a potential vector for preventive HIV type 1 vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 Jan 20;16(2):91-8.
- Farjot G, Buisson M, Duc Dodon M, Gazzolo L, Sergeant A, Mikaelian I. Epstein-Barr virus EB2 protein exports unspliced RNA via a Crm-1-independent pathway. *J Virol.* 2000 Jul;74(13):6068-76.
- Farjot G, Sergeant A, Mikaelian I. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):17309-17.
- Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):483-92.
- Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol.* 1991 Apr;65(4):1910-5.
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 18;91(2):664-8.
- Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Mar;86(5):1495-9.
- Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol.* 1997 Mar 1;158(5):2278-84.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996 May 10;272(5263):872-7.
- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, *et al.* The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature.* 1986 Mar 27-Apr 2;320(6060):367-71.
- Fitzon T, Leschonsky B, Bieler K, Paulus C, Schroder J, Wolf H, Wagner R. Proline residues in the HIV-1 NH2-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. *Virology.* 2000 Mar 15;268(2):294-307.
- Fleury B, Janvier G, Pialoux G, Buseyne F, Robertson MN, Tartaglia J, Paoletti E, Kieny MP, Excler JL, Riviere Y. Memory cytotoxic T lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-negative volunteers immunized with a recombinant canarypox expressing gp 160 of HIV-1 and boosted with a recombinant gp160. *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):734-8.
- Foecking MK, Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. Bui LA, Butterfield LH, Kim JY, Ribas A, Seu P, Lau R, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. In vivo therapy of hepatocellular carcinoma with a tumor-specific adenoviral vector expressing interleukin-2. *Hum Gene Ther.* 1997 Dec 10;8(18):2173-82.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell.* 1997 Sep 19;90(6):1051-60.
- Forster SM, Osborne LM, Cheingsong-Popov R, Kenny C, Burnell R, Jeffries DJ, Pinching AJ, Harris JR, Weber JN. Decline of anti-p24 antibody precedes antigenaemia as correlate of prognosis in HIV-1 infection. *AIDS.* 1987 Dec;1(4):235-40.
- Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res.* 1999;52:275-99. Review.
- Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, Fischer U, Albright AV, Gonzalez-Scarano F, Malim MH. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol.* 1998 Jul;72(7):6004-13.
- Fouchier RA, Simon JH, Jaffe AB, Malim MH, Turner BC, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999 Jan 8;285(1):1-32. Review. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8263-9.
- Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Pizzo PA, Fauci AS. Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Infect Dis.* 1991 Dec;164(6):1051-7.

- Francis DP, Gregory T, McElrath MJ, Belshe RB, Gorse GJ, Migasena S, Kitayaporn D, Pitisuttitham P, Matthews T, Schwartz DH, Berman PW. Advancing AIDSVAX to phase 3. Safety, immunogenicity, and plans for phase 3. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Oct;14 Suppl 3:S325-31. Review.
- Frankel EK, Yuan HE, Luban J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*. 1994 Nov 24;372(6504):359-62.
- Frankel FR, Hegde S, Lieberman J, Paterson Y. Induction of cell-mediated immune responses to human immunodeficiency virus type 1 Gag protein by using *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vector. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4775-82.
- Freed EO, Englund G, Martin MA. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol*. 1995 Jun;69(6):3949-54.
- Freed EO, Martin MA. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):341-51.
- Freed EO, Martin MA. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol*. 1995 Mar;69(3):1984-9.
- Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, Martin MA. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5311-20.
- Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998 Nov 10;251(1):1-15. Review.
- Friedman RS, Frankel FR, Xu Z, Lieberman J. Induction of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by *Listeria monocytogenes* and a hyperattenuated *Listeria* strain engineered to express HIV antigens. *J Virol*. 2000 Nov;74(21):9987-93.
- Fritz CC, Zapp ML, Green MR. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature*. 1995 Aug 10;376(6540):530-3.
- Froland SS, Jenum P, Lindboe CF, Wefring KW, Linnestad PJ, Bohmer T. HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. *Lancet*. 1988 Jun 11;1(8598):1344-5.
- Fu TM, Guan L, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. Induction of MHC class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. *Vaccine*. 1998 Nov;16(18):1711-7.
- Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med*. 1997 Jun;3(6):362-71.
- Fujinaga K, Taube R, Wimmer J, Cujec TP, Peterlin BM. Interactions between human cyclin T, Tat, and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1285-90.
- Fujiwara T, Mizuuchi K. Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell*. 1988 Aug 12;54(4):497-504.
- Fuller DH, Corb MM, Barnett S, Steimer K, Haynes JR. Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):924-6.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11478-82.
- Gallina A, Mantoan G, Rindi G, Milanesi G. Influence of MA internal sequences, but not of the myristylated N-terminus sequence, on the budding site of HIV-1 Gag protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov 15;204(3):1031-8.
- Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8324-6.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):436-41.
- Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 1995 Dec;2(10):710-22. Review.
- Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*. 1996 Jan 23;35(3):1027-36.
- Garber ME, Wei P, KewalRamani VN, Mayall TP, Hermann CH, Rice AP, Littman DR, Jones KA. The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev*. 1998 Nov 15;12(22):3512-27.
- Catignol A, Buckler-White A, Berkhout B, Jeang KT. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*. 1991 Mar 29;251(5001):1597-600.
- Gebhard JR, Zhu J, Cao X, Minnick J, Araneo BA. DNA immunization utilizing a herpes simplex virus type 2 myogenic DNA vaccine protects mice from mortality and prevents genital herpes. *Vaccine*. 2000 Mar 6;18(17):1837-46.
- Gelderblom H, Reupke H, Winkel T, Kunze R, Pauli G. MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch [C]*. 1987 Nov-Dec;42(11-12):1328-34.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*. 1987 Jan;156(1):171-6.
- Gelderblom HR, Ozel M, Pauli G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol*. 1989;106(1-2):1-13. Review.

- Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*. 1991 Jun;5(6):617-37. No abstract available.
- Ghazizadeh S, Carroll JM, Taichman LB. Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy. *J Virol*. 1997 Dec;71(12):9163-9.
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 1989 Oct 6;59(1):103-12.
- Ghiara JB, Ferguson DC, Satterthwait AC, Dyson HJ, Wilson IA. Structure-based design of a constrained peptide mimic of the HIV-1 V3 loop neutralization site. *J Mol Biol*. 1997 Feb 14;266(1):31-9.
- Ghoda L, Phillips MA, Bass KE, Wang CC, Coffino P. Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *J Biol Chem*. 1990 Jul 15;265(20):11823-6.
- Gibbs CJ Jr, Peters R, Gravell M, Johnson BK, Jensen FC, Carlo DJ, Salk J. Observations after human immunodeficiency virus immunization and challenge of human immunodeficiency virus seropositive and seronegative chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 15;88(8):3348-52.
- Gibellini D, Caputo A, Celeghini C, Bassini A, La Placa M, Capitani S, Zauli G. Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. *Br J Haematol*. 1995 Jan;89(1):24-33.
- Gileadi U, Moins-Teisserenc HT, Correa I, Booth BL Jr, Dunbar PR, Sewell AK, Trowsdale J, Phillips RE, Cerundolo V. Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):6045-52.
- Gilkeson GS, Pippen AM, Pisetsky DS. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest*. 1995 Mar;95(3):1398-402.
- Girard M, van der Ryst E, Barre-Sinoussi F, Nara P, Tartaglia J, Paoletti E, Blondeau C, Jennings M, Verrier F, Meignier B, Fultz PN. Challenge of chimpanzees immunized with a recombinant canarypox-HIV-1 virus. *Virology*. 1997 May 26;232(1):98-104.
- Goebel FD, Mannhalter JW, Belshe RB, Eibl MM, Grob PJ, de Gruttola V, Griffiths PD, Erfle V, Kunschak M, Engl W. Recombinant gp160 as a therapeutic vaccine for HIV-infection: results of a large randomized, controlled trial. European Multinational IMMUNO AIDS Vaccine Study Group. *AIDS*. 1999 Aug 20;13(12):1461-8.
- Goldstein G. HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nat Med*. 1996 Sep;2(9):960-4. Review.
- Goldstein NI, McIntosh AH. Glycoproteins of nuclear polyhedrosis viruses. *Arch Virol*. 1980;64(2):119-26.
- Gorny MK, Conley AJ, Karwowska S, Buchbinder A, Xu JY, Emini EA, Koenig S, Zolla-Pazner S. Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *J Virol*. 1992 Dec;66(12):7538-42.
- Gorse GJ, Corey L, Patel GB, Mandava M, Hsieh RH, Matthews TJ, Walker MC, McElrath MJ, Berman PW, Eibl MM, Belshe RB. HIV-1MN recombinant glycoprotein 160 vaccine-induced cellular and humoral immunity boosted by HIV-1MN recombinant glycoprotein 120 vaccine. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Jan 20;15(2):115-32.
- Gorse GJ, Keefer MC, Belshe RB, Matthews TJ, Forrest BD, Hsieh RH, Koff WC, Hanson CV, Dolin R, Weinhold KJ, Frey SE, Ketter N, Fast PE. A dose-ranging study of a prototype synthetic HIV-1MN V3 branched peptide vaccine. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*. 1996 Feb;173(2):330-9.
- Gorse GJ, McElrath MJ, Matthews TJ, Hsieh RH, Belshe RB, Corey L, Frey SE, Kennedy DJ, Walker MC, Eibl MM. Modulation of immunologic responses to HIV-1MN recombinant gp160 vaccine by dose and schedule of administration. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *Vaccine*. 1998 Mar;16(5):493-506.
- Gorse GJ, Patel GB, Mandava M, Berman PW, Belshe RB. MN and IIIB recombinant glycoprotein 120 vaccine-induced binding antibodies to native envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Jul 1;15(10):921-30.
- Gorse GJ, Patel GB, Newman FK, Belshe RB, Berman PW, Gregory TJ, Matthews TJ. Antibody to native human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins induced by IIIB and MN recombinant gp120 vaccines. The NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996 Jul;3(4):378-86.
- Gorse GJ, Yang EY, Belshe RB, Berman PW. Salivary binding antibodies induced by human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp120 vaccine. The NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996 Nov;3(6):769.
- Gotte M, Maier G, Onori AM, Cellai L, Wainberg MA, Heumann H. Temporal coordination between initiation of HIV (+)-strand DNA synthesis and primer removal. *J Biol Chem*. 1999 Apr 16;274(16):11159-69.
- Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5781-5.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Wolf H, Wagner R. Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10822-6.
- Graham BS, Matthews TJ, Belshe RB, Clements ML, Dolin R, Wright PF, Gorse GJ, Schwartz DH, Keefer MC, Bolognesi DP, et al. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody by priming with gp160 recombinant vaccinia and boosting with rgp160 in vaccinia-naïve adults. The NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J Infect Dis*. 1993 Mar;167(3):533-7.

- Graham FL, van der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*. 1973 Aug;54(2):536-9.
- Greenstein JL, Schad VC, Goodwin WH, Brauer AB, Bollinger BK, Chin RD, Kuo MC. A universal T cell epitope-containing peptide from hepatitis B surface antigen can enhance antibody specific for HIV gp120. *J Immunol*. 1992 Jun 15;148(12):3970-7.
- Gregoriadis G, Saffie R, de Souza JB. Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett*. 1997 Feb 3;402(2-3):107-10.
- Gringeri A, Santagostino E, Muca-Perja M, Le Buanec H, Bizzini B, Lachgar A, Zagury JF, Rappaport J, Burny A, Gallo RC, Zagury D. Tat toxoid as a component of a preventive vaccine in seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999 Apr 1;20(4):371-5.
- Gringeri A, Santagostino E, Muca-Perja M, Mannucci PM, Zagury JF, Bizzini B, Lachgar A, Carcagno M, Rappaport J, Criscuolo M, Blattner W, Burny A, Gallo RC, Zagury D. Safety and immunogenicity of HIV-1 Tat toxoid in immunocompromised HIV-1-infected patients. *J Hum Virol*. 1998 May-Jun;1(4):293-8.
- Groner A, Granados RR, Burand JP. Interaction of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines. *Intervirology*. 1984;21(4):203-9.
- Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KC, Garotta G, Schreiber RD. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):9944-51.
- Gruter P, Tabernero C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell*. 1998 Apr;1(5):649-59.
- Gupta K, Ott D, Hope TJ, Siliciano RF, Boeke JD. A human nuclear shuttling protein that interacts with human immunodeficiency virus type 1 matrix is packaged into virions. *J Virol*. 2000 Dec;74(24):11811-24.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:927-74. Review.
- Guzik BW, Levesque L, Prasad S, Bor YC, Black BE, Paschal BM, Rekosh D, Hammarskjöld ML. NXT1 (p15) is a crucial cellular cofactor in TAP-dependent export of intron-containing RNA in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001 Apr;21(7):2545-54.
- Haas J, Park EC, Seed B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*. 1996 Mar 1;6(3):315-24.
- Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Cladaras C, Athanassopoulos A, Tse A, Pavlakis GN. The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1265-74.
- Haffar O, Garrigues J, Travis B, Moran P, Zarling J, Hu SL. Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, gag-env particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):2653-9.
- Haffar OK, Smithgall MD, Moran PA, Travis BM, Zarling JM, Hu SL. HIV-specific humoral and cellular immunity in rabbits vaccinated with recombinant human immunodeficiency virus-like gag-env particles. *Virology*. 1991 Aug;183(2):487-95.
- Haga T, Kuwata T, Ui M, Igarashi T, Miyazaki Y, Hayami M. A new approach to AIDS research and prevention: the use of gene-mutated HIV-1/SIV chimeric viruses for anti-HIV-1 live-attenuated vaccines. *Microbiol Immunol*. 1998;42(4):245-51. Review.
- Hallenberger S, Moulard M, Sordel M, Klenk HD, Garten W. The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol*. 1997 Feb;71(2):1036-45.
- Hammerschmid M, Palmeri D, Ruhl M, Jaksche H, Weichselbraun I, Bohnlein E, Malim MH, Hauber J. Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J Virol*. 1994 Nov;68(11):7329-35.
- Hanke T, McMichael A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett*. 1999 Mar;66(1-3):177-81.
- Hanke T, Samuel RV, Blanchard TJ, Neumann VC, Allen TM, Boyson JE, Sharpe SA, Cook N, Smith GL, Watkins DI, Cranage MP, McMichael AJ. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol*. 1999 Sep;73(9):7524-32.
- Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine*. 1998 Feb;16(4):426-35.
- Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol*. 1994 Dec 1;153(11):4925-33.
- Harms JS, Splitter GA. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther*. 1995 Oct;6(10):1291-7.
- Harms JS, Splitter GA. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther*. 1995 Oct;6(10):1291-7.
- Harrer E, Harrer T, Buchbinder S, Mann DL, Feinberg M, Yilma T, Johnson RP, Walker BD. HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in healthy, long-term nonprogressing seropositive persons. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10 Suppl 2:S77-8. No abstract available.
- Harrer T, Harrer E, Barbosa P, Kaufmann F, Wagner R, Bruggemann S, Kalden JR, Feinberg M, Johnson RP, Buchbinder S, Walker BD. Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4875-81.

- Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 May 1;12(7):585-92.
- Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F, Margalith M, Barnhart K, Nolasco M, Vahlsing HL, Meek J, Marquet M, Hobart P, Norman J, Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther*. 1996 Jun 20;7(10):1205-17.
- Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther*. 1999 May;6(5):893-903.
- Hauber J, Malim MH, Cullen BR. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1181-7.
- Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Wiedera G, Fuller JT. Particle-mediated nucleic acid immunization. *J Biotechnol*. 1996 Jan 26;44(1-3):37-42. Review.
- Heath AW, Playfair JH. Cytokines as immunological adjuvants. *Vaccine*. 1992;10(7):427-34. Review.
- Heeney J, Akerblom L, Barnett S, Bogers W, Davis D, Fuller D, Koopman G, Lehner T, Mooij P, Morein B, de Giuli Morghen C, Rosenwirth B, Verschoor E, Wagner R, Wolf H. HIV-1 vaccine-induced immune responses which correlate with protection from SHIV infection: compiled preclinical efficacy data from trials with ten different HIV-1 vaccine candidates. *Immunol Lett*. 1999 Mar;66(1-3):189-95.
- Heile JM, Fong YL, Rosa D, Berger K, Saletti G, Campagnoli S, Bensi G, Capo S, Coates S, Crawford K, Dong C, Wininger M, Baker G, Cousens L, Chien D, Ng P, Archangel P, Grandi G, Houghton M, Abrignani S. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol*. 2000 Aug;74(15):6885-92.
- Heile JM, Fong YL, Rosa D, Berger K, Saletti G, Campagnoli S, Bensi G, Capo S, Coates S, Crawford K, Dong C, Wininger M, Baker G, Heininger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7311-5.
- Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW Jr, Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C. Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):1856-65.
- Herrmann CH, Carroll RG, Wei P, Jones KA, Rice AP. Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):9881-8.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):1783-6.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79. Review.
- Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):3099-104.
- Hinkula J, Lundholm P, Wahren B. Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes: a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):874-8.
- Hinkula J, Svanholm C, Schwartz S, Lundholm P, Brytting M, Engstrom G, Benthin R, Glaser H, Sutter G, Kohleisen B, Erle V, Okuda K, Wigzell H, Wahren B. Recognition of prominent viral epitopes induced by immunization with human immunodeficiency virus type 1 regulatory genes. *J Virol*. 1997 Jul;71(7):5528-39.
- Hirsch VM, Fuerst TR, Sutter G, Carroll MW, Yang LC, Goldstein S, Piatak M Jr, Elkins WR, Alvord WC, Montefiori DC, Moss B, Lifson JD. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J Virol*. 1996 Jun;70(6):3741-52.
- Ho DD. Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science*. 1998 Jun 19;280(5371):1866-7.
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*. 1996;30:405-39. Review.
- Hocini H, Belec L, Isacki S, Garin B, Pillot J, Becquart P, Bomsel M. High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997 Sep 20;13(14):1179-85.
- Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis*. 1999 May;179 Suppl 3:S448-53. Review.
- Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J, Ferrigno P, Sodroski J. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):10020-8.
- Hogervorst E, Jurriaans S, de Wolf F, van Wijk A, Wiersma A, Valk M, Roos M, van Gemen B, Coutinho R, Miedema F, et al. Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis*. 1995 Apr;171(4):811-21.
- Hohmann AW, Faulkner P. Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by Western blot analysis. *Virology*. 1983 Mar;125(2):432-44.

- Holzthutter HG, Frommel C, Klotzel PM. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J Mol Biol.* 1999 Mar 5;286(4):1251-65.
- Hone DM, Lewis GK, Beier M, Harris A, McDaniels T, Fouts TR. Expression of human immunodeficiency virus antigens in an attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. *Dev Biol Stand.* 1994;82:159-62. Review.
- Hone DM, Wu S, Powell RJ, Pascual DW, Van Cott J, McGhee J, Fouts TR, Tuskan RC, Lewis GK. Optimization of live oral *Salmonella*-HIV-1 vaccine vectors for the induction of HIV-specific mucosal and systemic immune responses. *J Biotechnol.* 1996 Jan 26;44(1-3):203-7. Review.
- Hope TJ, McDonald D, Huang XJ, Low J, Parslow TG. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J Virol.* 1990 Nov;64(11):5360-6.
- Hope TJ. The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys.* 1999 May 15;365(2):186-91. Review.
- Hope TJ. The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys.* 1999 May 15;365(2):186-91. Review.
- Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today.* 1999 Feb;20(2):89-94. Review.
- Hu SL, Klaniecki J, Dykers T, Sridhar P, Travis BM. Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 (BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1991 Jul;7(7):615-20.
- Huang LM, Joshi A, Willey R, Orenstein J, Jeang KT. Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans-activators: genetic evidence for a novel non-transcriptional function of Tat in virion infectivity. *EMBO J.* 1994 Jun 15;13(12):2886-96.
- Huang Y, Carmichael GC. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1534-42.
- Huang Y, Carmichael GC. A suboptimal 5' splice site is a cis-acting determinant of nuclear export of polyomavirus late mRNAs. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov;16(11):6046-54.
- Huang Y, Carmichael GC. The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10104-9.
- Huang Y, Kong WP, Nabel GJ. Human immunodeficiency virus type 1-specific immunity after genetic immunization is enhanced by modification of Gag and Pol expression. *J Virol.* 2001 May;75(10):4947-51.
- Huang Y, Wimler KM, Carmichael GC. Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *EMBO J.* 1999 Mar 15;18(6):1642-52.
- Huang ZM, Yen TS. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3864-9.
- Huang ZM, Yen TS. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3864-
- Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature.* 1990 May 24;345(6273):356-9.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):2563-7.
- Isel C, Karn J. Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol.* 1999 Jul 30;290(5):929-41.
- Ishii N, Fukushima J, Kaneko T, Okada E, Tani K, Tanaka SI, Hamajima K, Xin KQ, Kawamoto S, Koff W, Nishioka K, Yasuda T, Okuda K. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997 Nov 1;13(16):1421-8.
- Iwai S, Pritchard C, Mann DA, Karn J, Gait MJ. Recognition of the high affinity binding site in rev-response element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucleic Acids Res.* 1992 Dec 25;20(24):6465-72.
- Iwasaki A, Dela Cruz CS, Young AR, Barber BH. Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by minigene DNA immunization. *Vaccine.* 1999 Apr 9;17(15-16):2081-8.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.* 1999 Jul 19;190(2):229-39.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med.* 2000 Apr 17;191(8):1381-94.
- Jacks T, Madhani HD, Masiarz FR, Varmus HE. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell.* 1988 Nov 4;55(3):447-58.
- Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature.* 1988 Jan 21;331(6153):280-3.
- Jacks T, Varmus HE. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science.* 1985 Dec 13;230(4731):1237-42.
- Jamieson BD, Zack JA. Murine models for HIV disease. *AIDS.* 1999;13 Suppl A:S5-11. Review.

- Javaherian K, Langlois AJ, LaRosa GJ, Profy AT, Bolognesi DP, Herlihy WC, Putney SD, Matthews TJ. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science*. 1990 Dec 14;250(4987):1590-3.
- Jaynes JB, Chamberlain JS, Buskin JN, Johnson JE, Hauschka SD. Transcriptional regulation of the muscle creatine kinase gene and regulated expression in transfected mouse myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1986 Aug;6(8):2855-64.
- Jaynes JB, Chamberlain JS, Buskin JN, Johnson JE, Hauschka SD. Transcriptional regulation of the muscle creatine kinase gene and regulated expression in transfected mouse myoblasts. *Mol Cell Biol*. 1986 Aug;6(8):2855-64.
- Jaynes JB, Johnson JE, Buskin JN, Gartside CL, Hauschka SD. The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol Cell Biol*. 1988 Jan;8(1):62-70.
- Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem*. 1999 Oct 8;274(41):28837-40. Review.
- Johnson JE, Wold BJ, Hauschka SD. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1989 Aug;9(8):3393-9.
- Johnson RP, Desrosiers RC. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr Opin Immunol*. 1998 Aug;10(4):436-43. Review.
- Jonassen TO, Stene-Johansen K, Berg ES, Hungnes O, Lindboe CF, Froland SS, Grinde B. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology*. 1997 Apr 28;231(1):43-7.
- Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JC, Farrar GH. Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):814-7.
- Jones DH, Partidos CD, Steward MW, Farrar GH. Oral delivery of poly(lactide-co-glycolide) encapsulated vaccines. *Behring Inst Mitt*. 1997 Feb;(98):220-8. Review.
- Jowett JB, Hockley DJ, Nermut MV, Jones IM. Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J Gen Virol*. 1992 Dec;73 (Pt 12):3079-86.
- Kahn JO, Stites DP, Scillian J, Murcar N, Stryker R, Volberding PA, Naylor PH, Goldstein AL, Sarin PS, Simmon VF, *et al*. A phase I study of HGP-30, a 30 amino acid subunit of the human immunodeficiency virus (HIV) p17 synthetic peptide analogue sub-unit vaccine in seronegative subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992 Aug;8(8):1321-5.
- Kang CY, Luo L, Wainberg MA, Li Y. Development of HIV/AIDS vaccine using chimeric gag-env virus-like particles. *Biol Chem*. 1999 Mar;380(3):353-64.
- Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR. Analysis of cellular factors that mediate nuclear export of RNAs bearing the Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element. *J Virol*. 2000 Jul;74(13):5863-71.
- Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol*. 1994 Oct;68(10):6782-6.
- Karczewski MK, Strebel K. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):494-507.
- Karn J. Tackling Tat. *J Mol Biol*. 1999 Oct 22;293(2):235-54. Review.
- Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:133-73. Review.
- Kaul D, Ogra PL. Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. *Dev Biol Stand*. 1998;95:141-6. Review.
- Keefer MC, Graham BS, Belshe RB, Schwartz D, Corey L, Bolognesi DP, Stablein DM, Montefiori DC, McElrath MJ, Clements ML, *et al*. Studies of high doses of a human immunodeficiency virus type 1 recombinant glycoprotein 160 candidate vaccine in HIV type 1-seronegative humans. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994 Dec;10(12):1713-23.
- Keefer MC, Graham BS, McElrath MJ, Matthews TJ, Stablein DM, Corey L, Wright PF, Lawrence D, Fast PE, Weinhold K, Hsieh RH, Chernoff D, Dekker C, Dolin R. Safety and immunogenicity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTP-PE/MF59. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 May 20;12(8):683-93.
- Keefer MC, Wolff M, Gorse GJ, Graham BS, Corey L, Clements-Mann ML, Verani-Ketter N, Erb S, Smith CM, Belshe RB, Wagner LJ, McElrath MJ, Schwartz DH, Fast P. Safety profile of phase I and II preventive HIV type 1 envelope vaccination: experience of the NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997 Sep 20;13(14):1163-77.
- Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):10180-8.
- Kestler HW, Jeang KT. Attenuated retrovirus vaccines and AIDS. *Science*. 1995 Nov 17;270(5239):1219; discussion 1220-2. No abstract available.
- Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J*. 1999 Nov 1;18(21):6106-18.
- Kimpton J, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):2232-9.

- Kinter A, Arthos J, Cicala C, Fauci AS. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. *Immunol Rev.* 2000 Oct;177:88-98. Review.
- Kjems J, Brown M, Chang DD, Sharp PA. Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Feb 1;88(3):683-7.
- Kjems J, Frankel AD, Sharp PA. Specific regulation of mRNA splicing in vitro by a peptide from HIV-1 Rev. *Cell.* 1991 Oct 4;67(1):169-78.
- Kjems J, Sharp PA. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J Virol.* 1993 Aug;67(8):4769-76.
- Kjerrstrom A, Hinkula J, Engstrom G, Ovod V, Krohn K, Benthin R, Wahren B. Interactions of single and combined human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA vaccines. *Virology.* 2001 May 25;284(1):46-61.
- Klasse PJ, Moore JP. Kinetics of the HIV-CD4 interactions and virus-cell fusion. *AIDS.* 1992 Mar;6(3):325-7. No abstract available.
- Klavinskis LS, Gao L, Barnfield C, Lehner T, Parker S. Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine.* 1997 Jun;15(8):818-20.
- Klavinskis LS, Whitton JL, Joly E, Oldstone MB. Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology.* 1990 Oct;178(2):393-400.
- Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftinck-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H, Miedema F. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med.* 1995 Apr 1;181(4):1365-72.
- Klinman DM, Takeno M, Ichino M, Gu M, Yamshchikov G, Mor G, Conover J. DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin Immunopathol.* 1997;19(2):245-56. Review.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2;93(7):2879-83.
- Kolson DL, Collman R, Hrin R, Balliet JW, Laughlin M, McGann KA, Debouck C, Gonzalez-Scarano F. Human immunodeficiency virus type 1 Tat activity in human neuronal cells: uptake and trans-activation. *J Gen Virol.* 1994 Aug;75 (Pt 8):1927-34.
- Konforti BB, Koziolkiewicz MJ, Konarska MM. Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):863-73.
- Kostriks LG, Cao Y, Ngai H, Moore JP, Ho DD. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):445-58.
- Kotsopoulou E, Kim VN, Kingsman AJ, Kingsman SM, Mitrophanous KA. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J Virol.* 2000 May;74(10):4839-52.
- Koup RA, Ho DD. Shutting down HIV. *Nature.* 1994 Aug 11;370(6489):416. No abstract available.
- Koup RA, Pikora CA, Luzuriaga K, Brettler DB, Day ES, Mazzara GP, Sullivan JL. Limiting dilution analysis of cytotoxic T lymphocytes to human immunodeficiency virus gag antigens in infected persons: in vitro quantitation of effector cell populations with p17 and p24 specificities. *J Exp Med.* 1991 Dec 1;174(6):1593-600.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994 Jul;68(7):4650-5.
- Koup RA. Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med.* 1994 Sep 1;180(3):779-82.
- Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh WC, Terwilliger E, Dayton A, Rosen C, Haseltine W, Sodroski J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science.* 1987 Sep 11;237(4820):1351-5.
- Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol.* 1987 Aug 20;196(4):947-50.
- Kozak M. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol.* 1989 Nov;9(11):5134-42.
- Kozak M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol.* 1989 Nov;9(11):5073-80.
- Kozak M. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 May;83(9):2850-4.
- Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol.* 1989 Feb;108(2):229-41. Review.
- Krausslich HG, Ochsenbauer C, Traenckner AM, Mergener K, Facke M, Gelderblom HR, Bosch V. Analysis of protein expression and virus-like particle formation in mammalian cell lines stably expressing HIV-1 gag and env gene products with or without active HIV proteinase. *Virology.* 1993 Feb;192(2):605-17.
- Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12631-6.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995 Apr 6;374(6522):546-9.

- Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.* 1998 Jan;6(1):23-7. Review.
- Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol.* 1995 Nov;15(6):284-92. Review.
- Krieg AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol.* 1996 Feb;4(2):73-6. Review.
- Krishnan S, Haensler J, Meulien P. Paving the way towards DNA vaccines. *Nat Med.* 1995 Jun;1(6):521-2. No abstract available.
- Kumar A, Manna SK, Dhawan S, Aggarwal BB. HIV-Tat protein activates c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):776-81.
- Kurth R. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Nov 27;772:140-51. Review. No abstract available
- Kwak YT, Ivanov D, Guo J, Nee E, Gaynor RB. Role of the human and murine cyclin T proteins in regulating HIV-1 tat-activation. *J Mol Biol.* 1999 Apr 23;288(1):57-69.
- Kwissa M, von Kampen vK, Zurbriggen R, Gluck R, Reimann J, Schirmbeck R. Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. *Vaccine.* 2000 May 8;18(22):2337-44.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.
- LaCasse RA, Follis KE, Trahey M, Scarborough JD, Littman DR, Nunberg JH. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science.* 1999 Jan 15;283(5400):357-62.
- Lambert J. Tat toxoid: its potential role as an HIV vaccine. *J Hum Virol.* 1998 May-Jun;1(4):249-50.
- Lange J, Goudsmit J. Decline of antibody reactivity to HIV core protein secondary to increased production of HIV antigen. *Lancet.* 1987 Feb 21;1(8530):448. No abstract available.
- Langley RJ, Prince GA, Ginsberg HS. HIV type-1 infection of the cotton rat (*Sigmodon fulviventer* and *S. hispidus*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24;95(24):14355-60.
- Larochelle N, Lochmuller H, Zhao J, Jani A, Hallauer P, Hastings KE, Massie B, Prescott S, Petrof BJ, Karpati G, Nalbantoglu J. Efficient muscle-specific transgene expression after adenovirus-mediated gene transfer in mice using a 1.35 kb muscle creatine kinase promoter/enhancer. *Gene Ther.* 1997 May;4(5):465-72.
- LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Lewis JA, Langlois AJ, Dreesman GR, Boswell RN, Shadduck P, et al. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science.* 1990 Aug 24;249(4971):932-5.
- Lasic DD. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 1998 Jul;16(7):307-21. Review.
- Laukkanen T, Carr JK, Janssens W, Liitsola K, Gotte D, McCutchan E, Op de Coul E, Cornelissen M, Heyndrickx L, van der Groen G, alminen MO. Initially full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. *irology.* 2000 Mar 30;269(1):95-104.
- Laurence J. Reservoirs of HIV infection or carriage: monocytic, dendritic, follicular dendritic, and B cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Oct 29;693:52-64. Review..
- Layton GT, Harris SJ, Gearing AJ, Hill-Perkins M, Cole JS, Griffiths JC, Burns NR, Kingsman AJ, Adams SE. Induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo with hybrid HIV-1 V3:Ty-virus-like particles. *J Immunol.* 1993 Jul 15;151(2):1097-107.
- Le Buanec H, Lachgar A, Bizzini B, Zagury JF, Rappaport J, Santagostino E, Muca-Perja M, Gringeri A. A prophylactic and therapeutic AIDS vaccine containing as a component the innocuous Tat toxoid. *Biomed Pharmacother.* 1998;52(10):431-5.
- Le Buanec H, Vetu C, Lachgar A, Benoit MA, Gillard J, Paturance S, Aucouturier J, Gane V, Zagury D, Bizzini B. Induction in mice of anti-Tat mucosal immunity by the intranasal and oral routes. *Biomed Pharmacother.* 2001 Jul;55(6):316-20.
- Lee MS, Craigie R. Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9823-7.
- Lee YM, Tian CJ, Yu XF. A bipartite membrane-binding signal in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is required for the proteolytic processing of Gag precursors in a cell type-dependent manner. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):9061-8.
- Lehner T, Bergmeier LA, Panagiotidi C, Tao L, Brookes R, Klavinskis LS, Walker P, Walker J, Ward RG, Hussain L, et al. Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science.* 1992 Nov 20;258(5086):1365-9.
- Lenz C, Scheid A, Schaal H. Exon 1 leader sequences downstream of U5 are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):2757-64.
- Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW. Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9378-83.
- Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today.* 1996 May;17(5):217-24. Review.
- Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka FC Jr. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.* 1996 Mar;3(3):201-11.

- Lew D, Parker SE, Latimer T, Abai AM, Kuwahara-Rundell A, Doh SG, Yang ZY, Laface D, Gromkowski SH, Nabel GJ, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther.* 1995 May;6(5):553-64.
- Lewis PJ, van Drunen Littel-van den Hurk, Babiuk LA. Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. *J Virol.* 1999 Dec;73(12):10214-23.
- Lewis PJ, van Drunen Littel-Van Den Hurk, Babiuk LA. Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization with a DNA-based vaccine. *J Gen Virol.* 1999 Nov;80 (Pt 11):2829-37.
- Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science.* 1995 Apr 21;268(5209):429-31.
- Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem.* 1998 Dec 25;273(52):34970-5.
- Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect Immun.* 1999 Sep;67(9):4780-6.
- Li ZL, Paulin D. High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer. *J Biol Chem.* 1991 Apr 5;266(10):6562-70.
- Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol.* 1997 Sep;27(9):2340-4.
- Liu H, Wu X, Newman M, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):7630-8.
- Liu MA, Ulmer JB. Gene-based vaccines. *Mol Ther.* 2000 Jun;1(6):497-500. Review. No abstract available.
- Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Laribee N, Tanzi RE, Moir RD, Nath A, He JJ. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med.* 2000 Dec;6(12):1380-7.
- Loetscher P, Pratt G, Rechsteiner M. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis. *J Biol Chem.* 1991 Jun 15;266(17):11213-20.
- Loirat D, Li Z, Mancini M, Tiollais P, Paulin D, Michel ML. Muscle-specific expression of hepatitis B surface antigen: no effect on DNA-raised immune responses. *Virology.* 1999 Jul 20;260(1):74-83.
- Lotz M, Clark-Lewis I, Ganu V. HIV-1 transactivator protein Tat induces proliferation and TGF beta expression in human articular chondrocytes. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(3):365-71.
- Lu S, Arthos J, Montefiori DC, Yasutomi Y, Manson K, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Wissink J, Mullins JI, Haynes JR, Letvin NL, Wyand M, Robinson HL. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol.* 1996 Jun;70(6):3978-91.
- Lu S. Developing DNA vaccines against immunodeficiency viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;226:161-73. Review.
- Lu Y, Salvato MS, Pauza CD, Li J, Sodroski J, Manson K, Wyand M, Letvin N, Jenkins S, Touzjian N, Chutkowski C, Kushner N, LeFaile M, Payne LG, Roberts B. Utility of SHIV for testing HIV-1 vaccine candidates in macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996 Jun 1;12(2):99-106.
- Lu YL, Spearman P, Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol.* 1993 Nov;67(11):6542-50.
- Luo L, Li Y, Cannon PM, Kim S, Kang CY. Chimeric gag-V3 virus-like particles of human immunodeficiency virus induce virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1;89(21):10527-31.
- Lynch JA, deSouza M, Robb MD, Markowitz L, Nitayaphan S, Sapan CV, Mann DL, Bix DL, Cox JH. Cross-clade cytotoxic T cell response to human immunodeficiency virus type 1 proteins among HLA disparate North Americans and Thais. *J Infect Dis.* 1998 Oct;178(4):1040-6.
- MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Baine Y, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Coney LR, Ginsberg RS, Weiner DB. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis.* 1998 Jul;178(1):92-100.
- Mackewicz CE, Barker E, Levy JA. Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1393-5.
- Mackewicz CE, Blackbourn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):2308-12.
- Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet.* 1994 Dec 17;344(8938):1671-3.
- Maddon PJ, Dagleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 1986 Nov 7;47(3):333-48.
- Mahieux R, Lambert PF, Agbottah E, Halanski MA, Deng L, Kashanchi F, Brady JN. Cell cycle regulation of human interleukin-8 gene expression by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol.* 2001 Feb;75(4):1736-43.
- Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol.* 1991 Nov;65(11):5732-43.
- Malim MH, Cullen BR. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol.* 1993 Oct;13(10):6180-9.

- Malim MH, McCarn DF, Tiley LS, Cullen BR. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol*. 1991 Aug;65(8):4248-54.
- Manley JL, Proudfoot NJ. RNA 3' ends: formation and function--meeting review. *Genes Dev*. 1994 Feb 1;8(3):259-64.
- Mann DA, Frankel AD. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J*. 1991 Jul;10(7):1733-9.
- Mann DA, Mikaelian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, Kimura T, Singh M, Butler PJ, Gait MJ, Karn J. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J Mol Biol*. 1994 Aug 12;241(2):193-207.
- Manna SK, Aggarwal BB. Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5156-66.
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther*. 1993 Aug;4(4):419-31.
- Mariani R, Rasala BA, Rutter G, Wiegers K, Brandt SM, Krausslich HG, Landau NR. Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol*. 2001 Apr;75(7):3141-51.
- Mariani R, Rutter G, Harris ME, Hope TJ, Krausslich HG, Landau NR. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J Virol*. 2000 Apr;74(8):3859-70.
- Mariani S. A new HIV hideout. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1358.
- Marquet R, Baudin F, Gabus C, Darlix JL, Mouguel M, Ehresmann C, Ehresmann B. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res*. 1991 May 11;19(9):2349-57.
- Marshall RD. Glycoproteins. *Annu Rev Biochem*. 1972;41:673-702. Review. No abstract available.
- Martin SJ, Vyakarnam A, Cheingsong-Popov R, Callow D, Jones KL, Senior JM, Adams SE, Kingsman AJ, Matear P, Gotch FM, et al. Immunization of human HIV-seronegative volunteers with recombinant p17/p24:Ty virus-like particles elicits HIV-1 p24-specific cellular and humoral immune responses. *AIDS*. 1993 Oct;7(10):1315-23.
- Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, Belay SM, Belshe RB, Schwartz DH, Clements ML, Dolin R, Graham BS, Gorse GJ, Keefer MC, McElrath MJ, Walker MC, Wagner KF, McNeil JG, McCutchan FE, Burke DS. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*. 1996 Feb;173(2):340-8.
- Massiah MA, Starich MR, Paschall C, Summers MF, Christensen AM, Sundquist WL. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol*. 1994 Nov 25;244(2):198-223.
- Matthews TJ, Wild C, Chen CH, Bolognesi DP, Greenberg ML. Structural rearrangements in the transmembrane glycoprotein after receptor binding. *Immunol Rev*. 1994 Aug;140:93-104. Review.
- Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Ble C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med*. 1997 Nov;3(11):1250-7.
- McCloskey TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, Paul MO, Pahwa S, Verdin E, Chirmule N. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol*. 1997 Jan 15;158(2):1014-9.
- McCluskie MJ, Brazolot Millan CL, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, Widera G, Haynes JR, Purcell RH, Davis HL. Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med*. 1999 May;5(5):287-300.
- McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, Robbins KE, Gashau W, Nasidi A, Janssens W, Kalish ML. ubtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus ype 1 in Nigeria. *irology*. 1999 Feb 15;254(2):226-34.
- McDonnell WM, Askari FK. DNA vaccines. *N Engl J Med*. 1996 Jan 4;334(1):42-5. Review. No abstract available.
- McGhee JR, Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect Agents Dis*. 1993 Apr;2(2):55-73. Review.
- McIntosh AH, Shamy R. Biological studies of a baculovirus in a mammalian cell line. *Intervirology*. 1980;13(6):331-41.
- McMichael AJ, Hanke T. Is an HIV vaccine possible? *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):612-4.
- McRae B, Lange JA, Ascher MS, de Wolf F, Sheppard HW, Goudsmit J, Allain JP. Immune response to HIV p24 core protein during the early phases of human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1991 Aug;7(8):637-43.
- Meerloo T, Sheikh MA, Bloem AC, de Ronde A, Schutten M, van Els CA, Roholl PJ, Joling P, Goudsmit J, Schuurman HJ. Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. *J Gen Virol*. 1993 Jan;74 (Pt 1):129-35.
- Mergener K, Facke M, Welker R, Brinkmann V, Gelderblom HR, Krausslich HG. Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology*. 1992 Jan;186(1):25-39.
- Mergener K, Facke M, Welker R, Brinkmann V, Gelderblom HR, Krausslich HG. Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology*. 1992 Jan;186(1):25-39.
- Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol*. 1991 Sep 15;147(6):1759-64.

- Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Helland DG, Marasco WA. Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J*. 1995 Apr 3;14(7):1542-51.
- Mikaelian I, Krieg M, Gait MJ, Karn J. Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J Mol Biol*. 1996 Mar 29;257(2):246-64.
- Milani D, Mazzoni M, Borgatti P, Zauli G, Cantley L, Capitani S. Extracellular human immunodeficiency virus type-1 Tat protein activates phosphatidylinositol 3-kinase in PC12 neuronal cells. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):22961-4.
- Milani D, Mazzoni M, Zauli G, Mischiati C, Gibellini D, Giacca M, Capitani S. HIV-1 Tat induces tyrosine phosphorylation of p125FAK and its association with phosphoinositide 3-kinase in PC12 cells. *AIDS*. 1998 Jul 30;12(11):1275-84.
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*. 1997 Jul;71(7):5382-90.
- Milman G, Sharma O. Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994 Oct;10(10):1305-1
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, et al. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*. 1992 Jan;7(1):171-80.
- Moebius U, Clayton LK, Abraham S, Diener A, Yunis JJ, Harrison SC, Reinherz EL. Human immunodeficiency virus gp120 binding C'C" ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):12008-12.
- Moens U, Seternes OM, Hey AW, Silsand Y, Traavik T, Johansen B, Rekvig OP. In vivo expression of a single viral DNA-binding protein generates systemic lupus erythematosus-related autoimmunity to double-stranded DNA and histones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12393-7.
- Monsma SA, Blissard GW. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J Virol*. 1995 Apr;69(4):2583-95.
- Montefiori D, Moore JP. HIV vaccines. Magic of the occult? *Science*. 1999 Jan 15;283(5400):336-7.
- Montefiori DC, Evans TG. Toward an HIV type 1 vaccine that generates potent, broadly cross-reactive neutralizing antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 May 20;15(8):689-98.
- Moore J, Trkola A. HIV type 1 coreceptors, neutralization serotypes, and vaccine development. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997 Jun 10;13(9):733-6. Review.
- Moore JP, Burton DR. HIV-1 neutralizing antibodies: how full is the bottle? *Nat Med*. 1999 Feb;5(2):142-4.
- Moore JP, Cao Y, Leu J, Qin L, Korber B, Ho DD. Inter- and intraclade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):427-44.
- Moore JP, Klasse PJ. Thermodynamic and kinetic analysis of sCD4 binding to HIV-1 virions and of gp120 dissociation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992 Apr;8(4):443-50.
- Moore JP, Sodroski J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol*. 1996 Mar;70(3):1863-72.
- Moore JP, Stevenson M. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):40-9. Review.
- Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol*. 1997 Aug;9(4):551-62. Review.
- Moosmayer D, Reil H, Ausmeier M, Scharf JG, Hauser H, Jentsch KD, Hunsmann G. Expression and frameshifting but extremely inefficient proteolytic processing of the HIV-1 gag and pol gene products in stably transfected rodent cell lines. *Virology*. 1991 Jul;183(1):215-24.
- Mor G, Eliza M. Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Mol Biotechnol*. 2001 Nov;19(3):245-50.
- Mor G, Singla M, Steinberg AD, Hoffman SL, Okuda K, Klinman DM. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther*. 1997 Feb 10;8(3):293-300.
- Mor G, Yamshchikov G, Sedegah M, Takeno M, Wang R, Houghten RA, Hoffman S, Klinman DM. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15;98(12):2700-5.
- Morris CB, Thanawastien A, Sullivan DE, Clements JD. Identification of a peptide capable of inducing an HIV-1 Tat-specific CTL response. *Vaccine*. 2001 Oct 12;20(1-2):12-5.
- Morrow CD, Porter DC, Ansardi DC, Moldoveanu Z, Fultz PN. New approaches for mucosal vaccines for AIDS: encapsidation and serial passages of poliovirus replicons that express HIV-1 proteins on infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10 Suppl 2:S61-6. Review.
- Moss B, Carroll MW, Wyatt LS, Bennink JR, Hirsch VM, Goldstein S, Elkins WR, Fuerst TR, Lifson JD, Piatak M, Restifo NP, Overwijk W, Chamberlain R, Rosenberg SA, Sutter G. Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol*. 1996;397:7-13. Review.
- Munn R.J., Marx P.A., Yamamoto J.K. and Gardner M.B. Ultrastructural comparison of retroviruses associated with human and simian immunodeficiency syndrome, *Lab. Invest.* (1985) 53, 194-199
- Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tanaka K. Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 7;267(1):1-6. Review.

- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*. 1992 Dec 10;360(6404):597-9.
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther*. 1992 Dec;3(6):649-56.
- Nabell LM, Raja RH, Sayeski PP, Paterson AJ, Kudlow JE. Human immunodeficiency virus 1 Tat stimulates transcription of the transforming growth factor alpha gene in an epidermal growth factor-dependent manner. *Cell Growth Differ*. 1994 Jan;5(1):87-93.
- Naffakh N, Pinset C, Montarras D, Li Z, Paulin D, Danos O, Heard JM. Long-term secretion of therapeutic proteins from genetically modified skeletal muscles. *Hum Gene Ther*. 1996 Jan;7(1):11-21.
- Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*. 1998 Dec;4(12):1449-52.
- Nakamura Y, Kameoka M, Tobiume M, Kaya M, Ohki K, Yamada T, Ikuta K. A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine*. 1997 Apr;15(5):489-96.
- Nasioulas G, Zolotukhin AS, Tabernero C, Solomin L, Cunningham CP, Pavlakis GN, Felber BK. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol*. 1994 May;68(5):2986-93.
- Natuk RJ, Davis AR, Chanda PK, Lubeck MD, Chengalvala M, Murthy SC, Wade MS, Dheer SK, Bhat BM, Murthy KK, et al. Adenovirus vectored vaccines. *Dev Biol Stand*. 1994;82:71-7.
- Natuk RJ, Wade MS, Chengalvala M, Murthy KK, Chanda PK, Murthy SC, Bhat BM, Bhat R, Dheer SK, Mizutani S, et al. Adenovirus as vector for HIV: efficacy and safety issues. *Dev Biol Stand*. 1995;84:153-6.
- Nehete PN, Casement KS, Arlinghaus RB, Sastry KJ. Studies on in vivo induction of HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocytes by synthetic peptides from the V3 loop region of HIV-1 IIIB gp 120. *Cell Immunol*. 1995 Feb;160(2):217-23.
- Neisig A, Roelse J, Sijs AJ, Ossendorp F, Feltkamp MC, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J Immunol*. 1995 Feb 1;154(3):1273-9.
- Nermut MV, Hockley DJ, Bron P, Thomas D, Zhang WH, Jones IM. Further evidence for hexagonal organization of HIV gag protein in prebudding assemblies and immature virus-like particles. *J Struct Biol*. 1998 Oct;123(2):143-9.
- Nermut MV, Hockley DJ, Jowett JB, Jones IM, Garreau M, Thomas D. Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus. *Virology*. 1994 Jan;198(1):288-96.
- Neumann AU, Tubiana R, Calvez V, Robert C, Li TS, Agut H, Autran B, Katlama C. HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. *Comet Study Group. AIDS*. 1999 Apr 16;13(6):677-83.
- Neuveut C, Jeang KT. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol*. 1996 Aug;70(8):5572-81.
- Nichols J. 10 reasons you need a healthcare information systems integrator. *Healthc Inform*. 1996 Sep;13(9):26, 28, 30.
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Nov 27;772:30-9. Review.
- Nickerson CE, Trigona WL, Punt K, Freed DC, Guan L, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG, Emini EA, Shiver JW, Letvin NL. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science*. 2000 Oct 20;290(5491):486-92.
- Nie Z, Bergeron D, Subbramanian RA, Yao XJ, Checroune F, Rougeau N, Cohen EA. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol*. 1998 May;72(5):4104-15.
- Niedrig M, Gregersen JP, Fultz PN, Broker M, Mehdi S, Hilfenhaus J. Immune response of chimpanzees after immunization with the inactivated whole immunodeficiency virus (HIV-1), three different adjuvants and challenge. *Vaccine*. 1993;11(1):67-74.
- Niedrig M, Hinkula J, Weigelt W, L'age-Stehr J, Pauli G, Rosen J, Wahren B. Epitope mapping of monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 structural proteins by using peptides. *J Virol*. 1989 Aug;63(8):3525-8.
- Nilsson J, Askjaer P, Kjems J. A role for the basic patch and the C terminus of RanGTP in regulating the dynamic interactions with importin beta, CRM1 and RanBP1. *J Mol Biol*. 2001 Jan 12;305(2):231-43.
- Nixon DF, Townsend AR, Elvin JG, Rizza CR, Gallwey J, McMichael AJ. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature*. 1988 Dec 1;336(6198):484-7.
- Notka F, Stahl-Hennig C, Dittmer U, Wolf H, Wagner R. Accelerated clearance of SHIV in rhesus monkeys by virus-like particle vaccines is dependent on induction of neutralizing antibodies. *Vaccine*. 1999 Sep;18(3-4):291-301.
- Novitsky V, Rybak N, McLane MF, Gilbert P, Chigwedere P, Klein I, Gaolekwe S, Chang SY, Peter T, Thior I, Ndung'u T, Vannberg F, Foley BT, Marlink R, Lee TH, Essex M. Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtype C Gag-, Tat-, Rev-, and Nef-specific elispot-based cytotoxic T-lymphocyte responses for AIDS vaccine design. *J Virol*. 2001 Oct;75(19):9210-28.
- O'Hagan DT, Ugozzoli M, Barackman J, Singh M, Kazzaz J, Higgins K, Vancott TC, Ott G. Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1. *Vaccine*. 2000 Mar 6;18(17):1793-801.

- Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3638-47.
- Okuda K, Bukawa H, Hamajima K, Kawamoto S, Sekigawa K, Yamada Y, Tanaka S, Ishi N, Aoki I, Nakamura M. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995 Aug;11(8):933-43.
- Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W, Sodroski J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):5701-7.
- Oomens AG, Monsma SA, Blissard GW. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: synthesis, oligomerization, and processing. *Virology.* 1995 Jun 1;209(2):592-603.
- O'Reilly MM, McNally MT, Beemon KL. Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology.* 1995 Nov 10;213(2):373-85.
- Oscherwitz J, Zeigler ME, Gribbin TE, Cease KB. A V3 loop haptenic peptide sequence, when tandemly repeated, enhances immunogenicity by facilitating helper T-cell responses to a covalently linked carrier protein. *Vaccine.* 1999 May 14;17(19):2392-9.
- Osterhaus AD, van Baalen CA, Gruters RA, Schutten M, Siebelink CH, Hulskotte EG, Tijhaar EJ, Randall RE, van Amerongen G, Fleuchaus A, Erfle V, Sutter G. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine.* 1999 Jun 4;17(20-21):2713-4.
- Ott DE, Coren LV, Kane BP, Busch LK, Johnson DG, Sowder RC 2nd, Chertova EN, Arthur LO, Henderson LE. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol.* 1996 Nov;70(11):7734-43.
- Ott M, Emiliani S, Van Lint C, Herbein G, Lovett J, Chirmule N, McCloskey T, Pahwa S, Verdin E. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science.* 1997 Mar 7;275(5305):1481-5.
- Ott M, Lovett JL, Mueller L, Verdin E. Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors. *J Immunol.* 1998 Mar 15;160(6):2872-80.
- Otten GR, Doe B, Schaefer M, Chen M, Selby MJ, Goldbeck C, Hong M, Xu F, Ulmer JB. Relative potency of cellular and humoral immune responses induced by DNA vaccination. *Intervirology.* 2000;43(4-6):227-32.
- Paca RE, Ogert RA, Hibbert CS, Izaurralde E, Beemon KL. Rous sarcoma virus DR posttranscriptional elements use a novel RNA export pathway. *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9507-14.
- Pal R, Reitz MS Jr, Tschachler E, Gallo RC, Sarngadharan MG, Veronese FD. Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990 Jun;6(6):721-30.
- Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:487-512. Review.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9838-42.
- Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 15;93(21):11349-53. Review.
- Papsidero LD, Sheu M, Ruscetti FW. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibodies which react with p17 core protein: characterization and epitope mapping. *J Virol.* 1989 Jan;63(1):267-72.
- Partin K, Krausslich HG, Ehrlich L, Wimmer E, Carter C. Mutational analysis of a native substrate of the human immunodeficiency virus type 1 proteinase. *J Virol.* 1990 Aug;64(8):3938-47.
- Pasquinelli AE, Ernst RK, Lund E, Grimm C, Zapp ML, Rekosh D, Hammariskjold ML, Dahlberg JE. The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *EMBO J.* 1997 Dec 15;16(24):7500-10.
- Paulus C, Hellebrand S, Tessmer U, Wolf H, Krausslich HG, Wagner R. Competitive inhibition of human immunodeficiency virus type-1 protease by the Gag-Pol transframe protein. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21539-43.
- Pauza CD, Trivedi P, Wallace M, Ruckwardt TJ, Le Buanec H, Lu W, Bizzini B, Burny A, Zagury D, Gallo RC. Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3515-9.
- Pavli P, Maxwell L, Van de Pol E, Doe F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1996 Apr;104(1):124-32.
- Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* 1993 Dec;67(12):7229-37.
- Pertmer TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DH, Haynes JR. Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine.* 1995;13(15):1427-30.
- Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol.* 1996 Sep;70(9):6119-25.
- Pettit SC, Moody MD, Wehbie RS, Kaplan AH, Nantermet PV, Klein CA, Swanstrom R. The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol.* 1994 Dec;68(12):8017-27.
- Pettit SC, Sheng N, Tritch R, Erickson-Viitanen S, Swanstrom R. The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. *Adv Exp Med Biol.* 1998;436:15-25.

- Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis*. 1997 Oct;176(4):924-32.
- Pincus SH, Messer KG, Cole R, Ireland R, VanCott TC, Pinter A, Schwartz DH, Graham BS, Gorse GJ. Vaccine-specific antibody responses induced by HIV-1 envelope subunit vaccines. *J Immunol*. 1997 Apr 1;158(7):3511-20.
- Pinter A, Honnen WJ, Tilley SA, Bona C, Zaghoulani H, Gorny MK, Zolla-Pazner S. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1989 Jun;63(6):2674-9.
- Pisetsky DS. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity*. 1996 Oct;5(4):303-10. Review.
- Pisetsky DS. The immunologic properties of DNA. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):421-3. Review.
- Pisetsky DS. The influence of base sequence on the immunostimulatory properties of DNA. *Immunol Res*. 1999;19(1):35-46. Review.
- Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, Sanders-Buell E, Liu W, Chen J, Wagner R, Wolf H, hao Y, Lai S, Beyrer C, Yu XF. recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *Viol*. 2000 Dec;74(23):11286-95.
- Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature*. 1987 Jul 23-29;328(6128):348-51.
- Plata F. Implications of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in AIDS. *Biotherapy*. 1992;5(1):31-45. Review.
- Plempner RK, Wolf DH. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 1999 Jul;24(7):266-70. Review.
- Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol*. 1998;52:491-532. Review.
- Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem*. 1998 May 22;273(21):13347-52.
- Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1075-82.
- Powell DM, Zhang MJ, Konings DA, Wingfield PT, Stahl SJ, Dayton ET, Dayton AI. Sequence specificity in the higher-order interaction of the Rev protein of HIV-1 with its target sequence, the RRE. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995 Nov 1;10(3):317-23.
- Prasad VR, Goff SP. Structure-function studies of HIV reverse transcriptase. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;616:11-21. Review.
- Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science*. 1992 Jul 3;257(5066):76-80.
- Purcell DF, Martin MA. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6365-78.
- Purvis SF, Georges DL, Williams TM, Lederman MM. Suppression of interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in Jurkat cells stably expressing the human immunodeficiency virus Tat protein. *Cell Immunol*. 1992 Oct 1;144(1):32-42.
- Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther*. 1997 Nov 20;8(17):2019-29.
- Qiu JT, Liu B, Tian C, Pavlakis GN, Yu XF. Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. *J Virol*. 2000 Jul;74(13):5997-6005.
- Qiu JT, Song R, Dettenhofer M, Tian C, August T, Felber BK, Pavlakis GN, Yu XF. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J Virol*. 1999 Nov;73(11):9145-52.
- Ratner L, Fisher A, Jagodzinski LL, Mitsuya H, Liou RS, Gallo RC, Wong-Staal F. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1987 Spring;3(1):57-69.
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*. 1985 Jan 24-30;313(6000):277-84.
- Rautonen N, Rautonen J, Martin NL, Wara DW. HIV-1 Tat induces cytokine synthesis by uninfected mononuclear cells. *AIDS*. 1994 Oct;8(10):1504-6.
- Rayevskaya MV, Frankel FR. Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J Virol*. 2001 Mar;75(6):2786-91.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9519-23.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9519-23.

- Re MC, Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Roderigo G, De Rosa V, Zauli G, Lolli S, Capitani S, La Placa M. Effect of antibody to HIV-1 Tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995 Dec 1;10(4):408-16.
- Re MC, Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Zauli G, La Placa M. Antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat protein may have influenced the progression of AIDS in HIV-1-infected hemophiliac patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996 Mar;3(2):230-2.
- Re MC, Gibellini D, Vitone F, La Placa M. Antibody to HIV-1 Tat protein, a key molecule in HIV-1 pathogenesis. A brief review. *New Microbiol*. 2001 Apr;24(2):197-205. Review.
- Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996 Jul;21(7):267-71. Review.
- Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996 Jul;21(7):267-71. Review.
- Reddy TR, Xu W, Mau JK, Goodwin CD, Suhasini M, Tang H, Frimpong K, Rose DW, Wong-Staal F. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):635-42.
- Reid W, Sadowska M, Denaro F, Rao S, Foulke J Jr, Hayes N, Jones O, Doodnauth D, Davis H, Sill A, O'Driscoll P, Huso D, Fouts T, Lewis G, Hill M, Kamin-Lewis R, Wei C, Ray P, Gallo RC, Reitz M, Bryant J. An HIV-1 transgenic rat that develops HIV-related pathology and immunologic dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9271-6.
- Reil H, Bukovsky AA, Gelderblom HR, Gottlinger HC. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J*. 1998 May 1;17(9):2699-708.
- Reiss P, Lange JM, de Ronde A, de Wolf F, Dekker J, Debouck C, Goudsmit J. Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1. *J Med Virol*. 1990 Mar;30(3):163-8.
- Remus R, Kammer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol*. 1999 Feb;73(2):1010-22.
- Restifo NP, Bacik I, Irvine KR, Yewdell JW, McCabe BJ, Anderson RW, Eisenlohr LC, Rosenberg SA, Bennink JR. Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4414-22.
- Rey O, Canon J, Krogstad P. HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments. *Virology*. 1996 Jun 15;220(2):530-4.
- Rice AP, Mathews MB. Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the tat gene product. *Nature*. 1988 Apr 7;332(6164):551-3.
- Rice J, King CA, Spellerberg MB, Fairweather N, Stevenson FK. Manipulation of pathogen-derived genes to influence antigen presentation via DNA vaccines. *Vaccine*. 1999 Aug 6;17(23-24):3030-8.
- Richter-Cook NJ, Howard KJ, Cirino NM, Wohrl BM, Le Grice SF. Interaction of tRNA(Lys-3) with multiple forms of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem*. 1992 Aug 5;267(22):15952-7.
- Rivett AJ. Eukaryotic protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*. 1990 Dec;2(6):1143-9. Review.
- Rivett AJ. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J*. 1993 Apr 1;291 (Pt 1):1-10. Review.
- Rizvi TA, Schmidt RD, Lew KA, Keeling ME. Rev/RRE-independent Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element-dependent propagation of SIVmac239 vectors using a single round of replication assay. *Virology*. 1996 Aug 15;222(2):457-63.
- Rizvi TA, Schmidt RD, Lew KA. Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) functions in a position-dependent manner. *Virology*. 1997 Sep 15;236(1):118-29.
- Robertson JS. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine*. 1994 Dec;12(16):1526-8. Review.
- Robey WC, Arthur LO, Matthews TJ, Langlois A, Copeland TD, Lerche NW, Oroszlan S, Bolognesi DP, Gilden RV, Fischinger PJ. Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):7023-7.
- Robinson HL, Lu S, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Arthos J, Winsink J, Mullins JL, Montefiori D, Yasutomi Y, et al. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Nov 27;772:209-11.
- Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Kalish ML, Lydy SL, McClure HM. DNA priming and recombinant pox virus boosters for an AIDS vaccine. *Dev Biol (Basel)*. 2000;104:93-100.
- Robinson HL. DNA vaccines for immunodeficiency viruses. *AIDS*. 1997;11 Suppl A:S109-19. Review. No abstract available.
- Robinson HL. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):785-7. Review. No abstract available.
- Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:739-79. Review.
- Rodman TC, Pruslin FH, To SE, Winston R. Human immunodeficiency virus (HIV) Tat-reactive antibodies present in normal HIV-negative sera and depleted in HIV-positive sera. Identification of the epitope. *J Exp Med*. 1992 May 1;175(5):1247-53.
- Rodman TC, To SE, Hashish H, Manchester K. Epitopes for natural antibodies of human immunodeficiency virus (HIV)-negative (normal) and HIV-positive sera are coincident with two key functional sequences of HIV Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 15;90(16):7719-23.
- Rodrigues M, Li S, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW, Garcia-Sastre A, Nussenzweig RS, et al. Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol*. 1994 Nov 15;153(10):4636-48.

- Rodriguez F, An LL, Harkins S, Zhang J, Yokoyama M, Widera G, Fuller JT, Kincaid C, Campbell IL, Whitton JL. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol.* 1998 Jun;72(6):5174-81.
- Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8497-503.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 1986 Oct 17;234(4774):364-8.
- Rolph MS, Ramshaw IA. Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. *Curr Opin Immunol.* 1997 Aug;9(4):517-24. Review.
- Rosen CA, Terwilliger E, Dayton A, Sodroski JG, Haseltine WA. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(7):2071-5.
- Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Coulter PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature.* 2000 Sep 28;407(6803):523-6.
- Rosenberg-Hasson Y, Bercovich Z, Kahana C. Characterization of sequences involved in mediating degradation of ornithine decarboxylase in cells and in reticulocyte lysate. *Eur J Biochem.* 1991 Mar 28;196(3):647-51.
- Rosenberg-Hasson Y, Bercovich Z, Kahana C. cis-recognition and degradation of ornithine decarboxylase subunits in reticulocyte lysate. *Biochem J.* 1991 Aug 1;277 (Pt 3):683-5.
- Ross DW. Infectious vaccines. *Arch Pathol Lab Med.* 1998 Jan;122(1):100-1.
- Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, Fascio U, Zimmermann VS, Bondanza A, Ricciardi-Castagnoli P, Manfredi AA. Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999 Aug;66(2):345-9.
- Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol.* 1998 Nov 1;161(9):4467-71.
- Rovinski B, Haynes JR, Cao SX, James O, Sia C, Zolla-Pazner S, Matthews TJ, Klein MH. Expression and characterization of genetically engineered human immunodeficiency virus-like particles containing modified envelope glycoproteins: implications for development of a cross-protective AIDS vaccine. *J Virol.* 1992 Jul;66(7):4003-12.
- Royer M, Hong SS, Gay B, Cerutti M, Boulanger P. Expression and extracellular release of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursors by recombinant baculovirus-infected cells. *J Virol.* 1992 May;66(5):3230-5.
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 1989 Jan;63(1):1-8.
- Rubinstein A, Goldstein H, Pettoello-Mantovani M, Cryz SJ. Preliminary results of V3 loop peptide-primary neutralizing domain conjugate phase 1 vaccine trial. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10 Suppl 2:S149-53.
- Rubinstein A, Goldstein H, Pettoello-Mantovani M, Mizrahi Y, Bloom BR, Furer E, Althaus B, Que JU, Hasler T, Cryz SJ. Safety and immunogenicity of a V3 loop synthetic peptide conjugated to purified protein derivative in HIV-seronegative volunteers. *AIDS.* 1995 Mar;9(3):243-51.
- Rubinstein A, Mizrahi Y, Pettoello-Mantovani M, Lenz J, Liu GQ, Rubinstein Y, Goldstein H, Yust I, Burke M, Vardinon N, Spierer Z, Cryz SJ Jr. Immunologic responses of HIV-1-infected study subjects to immunization with a mixture of peptide protein derivative-V3 loop peptide conjugates. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999 Dec 15;22(5):467-76.
- Ruhl M, Himmelsbach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D, et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 1):1309-20.
- Ruitenbergh KM, Walker C, Love DN, Wellington JE, Whalley JM. A prime-boost immunization strategy with DNA and recombinant baculovirus-expressed protein enhances protective immunogenicity of glycoprotein D of equine herpesvirus 1 in naive and infection-primed mice. *Vaccine.* 2000 Jan 31;18(14):1367-73.
- Ruprecht RM. Live attenuated AIDS viruses as vaccines: promise or peril? *Immunol Rev.* 1999 Aug;170:135-49. Review.
- Ryu SE, Truneh A, Sweet RW, Hendrickson WA. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure.* 1994 Jan 15;2(1):59-74.
- Sabatier JM, Vives E, Mabrouk K, Benjouad A, Rochat H, Duval A, Hue B, Bahraoui E. Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1991 Feb;65(2):961-7.
- Sakaguchi K, Zambrano N, Baldwin ET, Shapiro BA, Erickson JW, Omichinski JG, Clore GM, Gronenborn AM, Appella E. Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun 1;90(11):5219-23.
- Salmon-Ceron D, Excler JL, Finkelsztejn L, Autran B, Gluckman JC, Sicard D, Matthews TJ, Meignier B, Valentin C, El Habib R, Blondeau C, Raux M, Moog C, Tartaglia J, Chong P, Klein M, Milcamps B, Heshmati F, Plotkin S. Safety and immunogenicity of a live recombinant canarypox virus expressing HIV type 1 gp120 MN MN tm/gag/protease LAI (ALVAC-HIV, vCP205) followed by a p24E-V3 MN synthetic peptide (CLTB-36) administered in healthy volunteers at low risk for HIV infection. AGIS Group and L'Agence Nationale de Recherches sur Le Sida. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999 May 1;15(7):633-45.

- Salmon-Ceron D, Excler JL, Sicard D, Blanche P, Finkelstzjen L, Gluckman JC, Autran B, Matthews TJ, Meignier B, Kieny MP, *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 glycoprotein 160 boosted by a V3 synthetic peptide in HIV-negative volunteers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995 Dec;11(12):1479-86.
- Sandri-Goldin RM. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev*. 1998 Mar 15;12(6):868-79.
- Saphire AC, Bobardt MD, Gally PA. Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J*. 1999 Dec 1;18(23):6771-85.
- Sastry KJ, Nehete PN, Venkatnarayanan S, Morkowski J, Platsoucas CD, Arlinghaus RB. Rapid in vivo induction of HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by a 15-amino acid unmodified free peptide from the immunodominant V3-loop of GP120. *Virology*. 1992 Jun;188(2):502-9.
- Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*. 1996 Jul 19;273(5273):352-4.
- Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F, Poignard P. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol*. 1993 Dec;67(12):7383-93.
- Sattentau QJ, Moore JP. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med*. 1991 Aug 1;174(2):407-15.
- Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med*. 1998 May 4;187(9):1439-49.
- Scala G, Ruocco MR, Ambrosino C, Mallardo M, Giordano V, Baldassarre F, Dragonetti E, Quinto I, Venuta S. The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med*. 1994 Mar 1;179(3):961-71.
- Schawaller M, Smith GE, Skehel JJ, Wiley DC. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology*. 1989 Sep;172(1):367-9.
- Schirmbeck R, Bohm W, Reimann J. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology*. 1996;39(1-2):111-9.
- Schirmbeck R, Deml L, Melber K, Wolf H, Wagner R, Reimann J. Priming of class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by vaccination with recombinant protein antigens. *Vaccine*. 1995 Jun;13(9):857-65.
- Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Selective stimulation of murine cytotoxic T cell and antibody responses by particulate or monomeric hepatitis B virus surface (S) antigen. *Eur J Immunol*. 1994 May;24(5):1088-96.
- Schirmbeck R, Reimann J. Enhancing the immunogenicity of exogenous hepatitis B surface antigen-based vaccines for MHC-I-restricted T cells. *Biol Chem*. 1999 Mar;380(3):285-91. Review.
- Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*. 1975 May 20;14(10):2214-8.
- Schlesinger DH, Goldstein G. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature*. 1975 May 29;255(5507):42304.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallan BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):857-60.
- Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol*. 1997 Jul;71(7):4892-903.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):770-4.
- Schubert U, Ott DE, Chertova EN, Welker R, Tessmer U, Princiotta MF, Bennink JR, Krausslich HG, Yewdell JW. Proteasome inhibition interferes with gag polypeptide processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13057-62.
- Schultz A. Encouraging vaccine results from primate models of HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Oct;14 Suppl 3:S261-3. Review.
- Schultz J, Dollenmaier G, Molling K. Update on antiviral DNA vaccine research (1998-2000). *Intervirology*. 2000;43(4-6):197-217. Review.
- Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Rangara R, Hassan A, Scherman D, Demeneix BA. Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther*. 1996 May;3(5):405-11.
- Schwartz S, Campbell M, Nasioulas G, Harrison J, Felber BK, Pavlakis GN. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J Virol*. 1992 Dec;66(12):7176-82.
- Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J Virol*. 1992 Jan;66(1):150-9.
- Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J Virol*. 1992 Jan;66(1):150-9.

- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999 Sep 3;285(5433):1569-72.
- Selby MJ, Doe B, Walker CM. Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte activity elicited by coimmunization with human immunodeficiency virus type 1 genes regulated by the bacteriophage T7 promoter and T7 RNA polymerase protein. *J Virol*. 1997 Oct;71(10):7827-31.
- Seth A, Ourmanov I, Kuroda MJ, Schmitz JE, Carroll MW, Wyatt LS, Moss B, Forman MA, Hirsch VM, Letvin NL. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 18;95(17):10112-6.
- Severino ME, Sipsas NV, Nguyen PT, Kalams SA, Walker BD, Johnson RP, Yang OO. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary CD4(+) T lymphocytes, monocytes, and dendritic cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 2000 Jul;74(14):6695-9.
- Sheets RL, Goldenthal KL. Traditional approach preventive HIV vaccines: What are the cell substrate and inactivation issues? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 May 1;14(7):627-33.
- Shehu-Xhilaga M, Kraeusslich HG, Pettit S, Swanstrom R, Lee JY, Marshall JA, Crowe SM, Mak J. Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation. *J Virol*. 2001 Oct;75(19):9156-64.
- Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):5058-68.
- Shiver JW, Davies ME, Perry HC, Freed DC, Liu MA. Humoral and cellular immunities elicited by HIV-1 vaccination. *J Pharm Sci*. 1996 Dec;85(12):1317-24.
- Shiver JW, Davies ME, Yasutomi Y, Perry HC, Freed DC, Letvin NL, Liu MA. Anti-HIV env immunities elicited by nucleic acid vaccines. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):884-7.
- Shukla RR, Marques SM, Kimmel PL, Kumar A. Human chromosome 6- and 11-encoded factors support human immunodeficiency virus type 1 Rev function in A9 cells. *J Virol*. 1996 Dec;70(12):9064-8.
- Singh M, Briones M, Ott G, O'Hagan D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 18;97(2):811-6.
- Smith AD, Geisler SC, Chen AA, Resnick DA, Roy BM, Lewi PJ, Arnold E, Arnold GF. Human rhinovirus type 14: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) V3 loop chimeras from a combinatorial library induce potent neutralizing antibody responses against HIV-1. *J Virol*. 1998 Jan;72(1):651-9.
- Smith AJ, Cho MI, Hammarskjöld ML, Rekosh D. Human immunodeficiency virus type 1 Pr55gag and Pr160gag-pol expressed from a simian virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into viruslike particles. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):2743-50.
- Smith HA. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine*. 1994 Dec;12(16):1515-9.
- Snyder HL, Bacik I, Yewdell JW, Behrens TW, Bennink JR. Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. *Eur J Immunol*. 1998 Apr;28(4):1339-46.
- Snyder HL, Yewdell JW, Bennink JR. Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2389-94.
- Sommer T, Wolf DH. Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J*. 1997 Dec;11(14):1227-33. Review.
- Soros VB, Carvajal HV, Richard S, Cochrane AW. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *J Virol*. 2001 Sep;75(17):8203-15.
- Soudeyns H, Pantaleo G. The moving target: mechanisms of HIV persistence during primary infection. *Immunol Today*. 1999 Oct;20(10):446-50. Review.
- Speck RF, Penn ML, Wimmer J, Esser U, Hague BF, Kindt TJ, Atchison RE, Goldsmith MA. Rabbit cells expressing human CD4 and human CCR5 are highly permissive for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1998 Jul;72(7):5728-34.
- Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee JR. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol*. 1994 Aug;6(4):572-83. Review.
- Staerz UD, Karasuyama H, Garner AM. Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature*. 1987 Oct 1-7;329(6138):449-51.
- Stahl-Hennig C, Dittmer U, Nisslein T, Pekrun K, Petry H, Jurkiewicz E, Fuchs D, Wachter H, Rud EW, Hunsmann G. Attenuated SIV imparts immunity to challenge with pathogenic spleen-derived SIV but cannot prevent repair of the nef deletion. *Immunol Lett*. 1996 Jun;51(1-2):129-35.
- Stanhope PE, Clements ML, Siliciano RF. Human CD4+ cytolytic T lymphocyte responses to a human immunodeficiency virus type 1 gp160 subunit vaccine. *J Infect Dis*. 1993 Jul;168(1):92-100.
- Stein BS, Engleman EG. Mechanism of HIV-1 entry into CD4+ T cells. *Adv Exp Med Biol*. 1991;300:71-86; discussion 87-96.
- Sternberg EA, Spizz G, Perry WM, Vizard D, Weil T, Olson EN. Identification of upstream and intragenic regulatory elements that confer cell-type-restricted and differentiation-specific expression on the muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*. 1988 Jul;8(7):2896-909.

- Stevceva L, Tryniszewska E, Hel Z, Nacsa J, Kelsall B, Washington Parks R, Franchini G. Differences in time of virus appearance in the blood and virus-specific immune responses in intravenous and intrarectal primary SIVmac251 infection of rhesus macaques; a pilot study. *BMC Infect Dis.* 2001;1(1):9.
- Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1551-60.
- Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G. Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine.* 2000 Nov 22;19(7-8):810-5.
- Su L, Graf M, Zhang Y, von Briesen H, Xing H, Kostler J, Melzl H, Wolf H, Shao Y, Wagner . haracterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a revalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *Viol.* 2000 Dec;74(23):11367-76.
- Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 15;89(22):10847-51.
- Sutter G, Moss B. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand.* 1995;84:195-200.
- Taberner C, Zolotukhin AS, Valentin A, Pavlakis GN, Felber BK. The posttranscriptional control element of the simian retrovirus type 1 forms an extensive RNA secondary structure necessary for its function. *J Virol.* 1996 Sep;70(9):5998-6011.
- Tadokoro K, Koizumi Y, Miyagi Y, Kojima Y, Kawamoto S, Hamajima K, Okuda K, Tanaka S, Onari K, Wahren B, Aoki I, Okuda K. Rapid and wide-reaching delivery of HIV-1 env DNA vaccine by intranasal administration. *Viral Immunol.* 2001 Jun;14(2):159-67.
- Tahtinen M, Strengell M, Collings A, Pitkanen J, Kjerrstrom A, Hakkarainen K, Peterson P, Kohleisen B, Wahren B, Ranki A, Ustav M, Krohn K. DNA vaccination in mice using HIV-1 nef, rev and tat genes in self-replicating pBN-vector.nVaccine. 2001 Feb 28;19(15-16):2039-47.
- Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, Cease KB, Houghten R, Cornette JL, DeLisi C, Moss B, Germain RN, Berzofsky JA. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes.
- Takashima A, Morita A. Dendritic cells in genetic immunization. *J Leukoc Biol.* 1999 Aug;66(2):350-6. Review.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992 Mar 12;356(6365):152-4.
- Tang H, Gaietta GM, Fischer WH, Ellisman MH, Wong-Staal F. A cellular cofactor for the constitutive transport element of type D retrovirus. *Science.* 1997 May 30;276(5317):1412-5.
- Tange TO, Jensen TH, Kjems J. In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 Rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein, p32. *J Biol Chem.* 1996 Apr 26;271(17):10066-72.
- Tartaglia J, Cox WI, Pincus S, Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev Biol Stand.* 1994;82:125-9. Review.
- Tartaglia J, Cox WI, Taylor J, Perkus M, Riviere M, Meignier B, Paoletti E. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992 Aug;8(8):1445-7. No abstract available.
- Tessmer U, Krausslich HG. Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3459-63.
- Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* 1994 Nov 24;372(6504):363-5.
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol.* 1993 Jul;67(7):3978-88.
- Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, Hernandez J, Haussler A, Ferreira EA, Liewer U, Biggs J, Levine AJ, Huber C, Koszinowski UH, Kloetzel PM, Sherman LA. The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med.* 1998 Sep 21;188(6):1017-28.
- Tiley LS, Malim MH, Tewary HK, Stockley PG, Cullen BR. Identification of a high-affinity RNA-binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 15;89(2):758-62.
- Tjia ST, zu Altschiltschesche GM, Doerfler W. Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology.* 1983 Feb;125(1):107-17.
- Tobery TW, Siliciano RF. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J Exp Med.* 1997 Mar 3;185(5):909-20.
- Tobin GJ, Li GH, Williamson JC, Nagashima K, Gonda MA. Synthesis and assembly of chimeric human immunodeficiency virus gag pseudovirions. *Intervirology.* 1996;39(1-2):40-8. Review.
- Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4529-32.
- Torres CA, Yang K, Mustafa F, Robinson HL. DNA immunization: effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses. *Vaccine.* 1999 Dec 10;18(9-10):805-14.

- Tovanabutra S, Polonis V, De Souza M, Trichavaroj R, hanbancherd P, Kim B, Sanders-Buell E, Nitayaphan S, Brown A, obb MR, Bix DL, McCutchan FE, Carr JK. *irst CRF01_AE/B recombinant of HIV-1 is found in Thailand. IDS. 2001 May 25;15(8):1063-5.*
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.*
- Trauger RJ, Daigle AE, Giermakowska W, Moss RB, Jensen F, Carlo DJ. Safety and immunogenicity of a gp120-depleted, inactivated HIV-1 immunogen: results of a double-blind, adjuvant controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1995;10 Suppl 2:S74-82.*
- Trinh DP, Brown KM, Jeang KT. Epithelin/granulin growth factors: extracellular cofactors for HIV-1 and HIV-2 Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun. 1999 Mar 16;256(2):299-306.*
- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature. 1996 Nov 14;384(6605):184-7.*
- Trono D, Baltimore D. A human cell factor is essential for HIV-1 Rev action. *EMBO J. 1990 Dec;9(12):4155-60.*
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):1-32. Review.*
- Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem. 2001 Feb 2;276(5):3254-61.*
- Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnhly JJ, Liu MA. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology. 1996 Sep;89(1):59-67.*
- Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Fu TM, Donnelly JJ, Caulfield MJ, Liu MA. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine. 1997 Jun;15(8):839-41.*
- Ulmer JB, Deck RR, Yawman A, Friedman A, Dewitt C, Martinez D, Montgomery DL, Donnelly JJ, Liu MA. DNA vaccines for bacteria and viruses. *Adv Exp Med Biol. 1996;397:49-53. Review.*
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science. 1993 Mar 19;259(5102):1745-9.*
- Ulmer JB, Otten GR. Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming. *Dev Biol (Basel). 2000;104:9-14.*
- Ulmer JB, Sadoff JC, Liu MA. DNA vaccines. *Curr Opin Immunol. 1996 Aug;8(4):531-6. Review.*
- Vaishnav YN, Vaishnav M, Wong-Staal F. Identification and characterization of a nuclear factor that specifically binds to the Rev response element (RRE) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *New Biol. 1991 Feb;3(2):142-50.*
- Valvatne H, Szilvay AM, Helland DE. A monoclonal antibody defines a novel HIV type 1 Tat domain involved in trans-cellular trans-activation. *AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 May 1;12(7):611-9.*
- van Baalen CA, Pontesilli O, Huisman RC, Geretti AM, Klein MR, de Wolf F, Miedema F, Gruters RA, Osterhaus AD. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol. 1997 Aug;78 (Pt 8):1913-8.*
- VanCott TC, Bethke FR, Burke DS, Redfield RR, Bix DL. Lack of induction of antibodies specific for conserved, discontinuous epitopes of HIV-1 envelope glycoprotein by candidate AIDS vaccines. *J Immunol. 1995 Oct 15;155(8):4100-10.*
- Varshavsky A, Bachmair A, Finley D. The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications. *Biochem Soc Trans. 1987 Oct;15(5):815-6.*
- Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S. Selection, recombination, and G----A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol. 1991 Apr;65(4):1779-88.*
- Veenstra J, Williams IG, Colebunders R, Dorrell L, Tchamouroff SE, Patou G, Lange JM, Weller IV, Goeman J, Uthayakumar S, Gow IR, Weber JN, Coutinho RA. Immunization with recombinant p17/p24:Ty virus-like particles in human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis. 1996 Oct;174(4):862-6.*
- Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, Ciccarelli RB, Evans M, Man S, Smith L, Kast WM. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol. 2001 May 1;166(9):5366-73.*
- Veronese FD, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J Virol. 1988 Mar;62(3):795-801.*
- Victorino RM, Sousa AE. Attenuated vaccines for AIDS. *Lancet. 1995 Jul 15;346(8968):179. No abstract available.*
- Vidalin O, Tanaka E, Spengler U, Trepo C, Inchauspe G. Targeting of hepatitis C virus core protein for MHC I or MHC II presentation does not enhance induction of immune responses to DNA vaccination. *DNA Cell Biol. 1999 Aug;18(8):611-21.*
- Vincent MJ, Melsen LR, Martin AS, Compans RW. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol. 1999 Oct;73(10):8138-44.*
- Vink C, Plasterk RH. The human immunodeficiency virus integrase protein. *Trends Genet. 1993 Dec;9(12):433-8. Review.*
- Vinner L, Nielsen HV, Bryder K, Corbet S, Nielsen C, Fomsgaard A. Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine. 1999 Apr 23;17(17):2166-75.*

- Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S. Gene transfer in regenerating muscle. *Hum Gene Ther.* 1994 Jan;5(1):11-8.
- Vitiello L, Bockhold K, Joshi PB, Worton RG. Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC:DOPE liposomes. *Gene Ther.* 1998 Oct;5(10):1306-13.
- Vitiello L, Chonn A, Wasserman JD, Duff C, Worton RG. Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells. *Gene Ther.* 1996 May;3(5):396-404.
- Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):16010-7.
- Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* 1998 Jan 15;12(2):175-85.
- Wagner R, Boltz T, Deml L, Modrow S, Wolf H. Induction of cytolytic T lymphocytes directed towards the V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 external glycoprotein gp120 by p55gag/V3 chimeric vaccinia viruses. *J Gen Virol.* 1993 Jul;74 (Pt 7):1261-9.
- Wagner R, Deml L, Fließbach H, Wanner G, Wolf H. Assembly and extracellular release of chimeric HIV-1 Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology.* 1994 Apr;200(1):162-75.
- Wagner R, Deml L, Notka F, Wolf H, Schirmbeck R, Reimann J, Teeuwse V, Heeney J. Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and rhesus macaques. *Intervirology.* 1996;39(1-2):93-103. Review.
- Wagner R, Deml L, Schirmbeck R, Niedrig M, Reimann J, Wolf H. Construction, expression, and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology.* 1996 Jun 1;220(1):128-40.
- Wagner R, Deml L, Teeuwse V, Heeney J, Yiming S, Wolf H. A recombinant HIV-1 virus-like particle vaccine: from concepts to a field study. *Antibiot Chemother.* 1996;48:68-83. Review.
- Wagner R, Deml L, Wolf H. Polyvalent, recombinant HIV-1 virus-like particles: novel HIV-1 vaccine strategies. *Antibiot Chemother.* 1994;46:48-61. Review.
- Wagner R, Leschonsky B, Harrer E, Paulus C, Weber C, Walker BD, Buchbinder S, Wolf H, Kalden JR, Harrer T. Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3727-34.
- Wagner R, Teeuwse VJ, Deml L, Notka F, Haaksma AG, Jhaghoorsingh SS, Niphuis H, Wolf H, Heeney JL. Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology.* 1998 May 25;245(1):65-74.
- Wahren B, Hinkula J, Stahle EL, Borrebaeck CA, Schwartz S, Wigzell H. Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Nov 27;772:278-81.
- Wain-Hobson S. AIDS. Virological mayhem. *Nature.* 1995 Jan 12;373(6510):102.
- Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature.* 1987 Jul 23-29;328(6128):345-8.
- Walker BD, Plata F. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS.* 1990 Mar;4(3):177-84. Review.
- Walser A, Rinke Y, Deppert W. Only a minor fraction of plasma membrane-associated large T antigen in simian virus 40-transformed mouse tumor cells (mKSA) is exposed on the cell surface. *J Virol.* 1989 Sep;63(9):3926-33.
- Wang B, Boyer J, Srikantan V, Coney L, Carrano R, Phan C, Merva M, Dang K, Agadjanian M, Gilbert L, et al. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* 1993 Nov;12(9):799-805.
- Wang B, Boyer JD, Ugen KE, Srikantan V, Ayyaroo V, Agadjanian MG, Williams WV, Newman M, Coney L, Carrano R, et al. Nucleic acid-based immunization against HIV-1: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS.* 1995;9 Suppl A:S159-70. Review. No abstract available.
- Wang JJ, Lu Y, Ratner L. Particle assembly and Vpr expression in human immunodeficiency virus type 1-infected cells demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Virol.* 1994 Oct;75 (Pt 10):2607-14.
- Wang Y, Chen D, Androlewicz MJ. The role of endoplasmic reticulum-associated protein degradation in MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 1999 Dec;172:67-72. Review.
- Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:821-50. Review.
- Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science.* 1990 Sep 14;249(4974):1281-5.
- Weeks KM, Crothers DM. RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove? *Cell.* 1991 Aug 9;66(3):577-88.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 1998 Feb 20;92(4):451-62.
- Weiss RA, Clapham PR. Hot fusion of HIV. *Nature.* 1996 Jun 20;381(6584):647-8.
- Welker R, Kottler H, Kalbitzer HR, Krausslich HG. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology.* 1996 May 1;219(1):228-36.

- West MJ, Karn J. Stimulation of Tat-associated kinase-independent transcriptional elongation from the human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat by a cellular enhancer. *EMBO J*. 1999 Mar 1;18(5):1378-86.
- Westberg C, Yang JP, Tang H, Reddy TR, Wong-Staal F. A novel shuttle protein binds to RNA helicase A and activates the retroviral constitutive transport element. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21396-401.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):497-500.
- Westendorp MO, Li-Weber M, Frank RW, Krammer PH. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4177-85.
- Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Droge W, Lehmann V. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J*. 1995 Feb 1;14(3):546-54.
- Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Droge W, Lehmann V. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J*. 1995 Feb 1;14(3):546-54.
- Whalen RG, Leclerc C, Deriaud E, Schirmbeck R, Reimann J, Davis HL. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen. Activation and entrainment of the immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Nov 27;772:64-76. Review.
- Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Doh SG, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M., Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH. A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11454-9.
- Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:275-306. Review. No abstract available.
- Whitton JL, Sheng N, Oldstone MB, McKee TA. A "string-of-beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *J Virol*. 1993 Jan;67(1):348-52.
- Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol*. 1998 Apr;72(4):2846-54.
- Wild C, Dubay JW, Greenwell T, Baird T Jr, Oas TG, McDanal C, Hunter E, Matthews T. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12676-80.
- Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):1880-7.
- Wilk T, Gowen B, Fuller SD. Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein. *J Virol*. 1999 Mar;73(3):1931-40.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*. 1980 Aug 25;255(16):7529-32.
- Wills JW, Craven RC. Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS*. 1991 Jun;5(6):639-54.
- Wilson W, Braddock M, Adams SE, Rathjen PD, Kingsman SM, Kingsman AJ. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*. 1988 Dec 23;55(6):1159-69.
- Winegar RA, Monforte JA, Suing KD, O'Loughlin KG, Rudd CJ, Macgregor JT. Determination of tissue distribution of an intramuscular plasmid vaccine using PCR and in situ DNA hybridization. *Hum Gene Ther*. 1996 Nov 10;7(17):2185-94.
- Winslow BJ, Trono D. The blocks to human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev functions in mouse cell lines are independent. *J Virol*. 1993 Apr;67(4):2349-54.
- Wodrich H, Schambach A, Krausslich HG. Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner. *Nucleic Acids Res*. 2000 Feb 15;28(4):901-10.
- Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol*. 1997 Feb;4(2):139-47.
- Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, Williams P, Slautterback DB. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci*. 1992 Dec;103 (Pt 4):1249-59.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*. 1992 Sep;1(6):363-9.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*. 1992 Sep;1(6):363-9.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques*. 1991 Oct;11(4):474-85.
- Wu Y, Kipps TJ. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J Immunol*. 1997 Dec 15;159(12):6037-43.

- Wyand MS, Manson KH, Lackner AA, Desrosiers RC. Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus. *Nat Med.* 1997 Jan;3(1):32-6.
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):705-11.
- Wyma DJ, Kotov A, Aiken C. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9381-7.
- Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 1977;7(3):159-66.
- Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol.* 1992 Jun 15;148(12):4072-6.
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol.* 1992;36(9):983-97.
- Yang JP, Tang H, Reddy TR, Wong-Staal F. Mapping the functional domains of HAP95, a protein that binds RNA helicase A and activates the constitutive transport element of type D retroviruses. *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):30694-700.
- Yellen-Shaw AJ, Eisenlohr LC. Regulation of class I-restricted epitope processing by local or distal flanking sequence. *J Immunol.* 1997 Feb 15;158(4):1727-33.
- Yellen-Shaw AJ, Laughlin CE, Mettrione RM, Eisenlohr LC. Murine transporter associated with antigen presentation (TAP) preferences influence class I-restricted T cell responses. *J Exp Med.* 1997 Nov 17;186(10):1655-62.
- Yellen-Shaw AJ, Wherry EJ, Dubois GC, Eisenlohr LC. Point mutation flanking a CTL epitope ablates in vitro and in vivo recognition of a full-length viral protein. *J Immunol.* 1997 Apr 1;158(7):3227-34.
- Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):1823-6. Review.
- Yewdell JW, Bennink JR. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:579-606. Review.
- Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci.* 2001 Mar;114(Pt 5):845-51. Review.
- Yewdell JW, Snyder HL, Bacik I, Anton LC, Deng Y, Behrens TW, Bachi T, Bennink JR. TAP-independent delivery of antigenic peptides to the endoplasmic reticulum: therapeutic potential and insights into TAP-dependent antigen processing. *J Immunother.* 1998 Mar;21(2):127-31. Review.
- Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol.* 1996 Dec 15;157(12):5394-402.
- Yokoyama M, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. Effect of transcriptional regulatory sequences on autonomous replication of plasmids in transient mammalian systems. *Biol Pharm Bull.* 1997 Jun;20(6):613-20.
- Yokoyama M, Hassett DE, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization can stimulate florid local inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site. *Vaccine.* 1997 Apr;15(5):553-60.
- York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:369-96. Review.
- Yu Z, Karem KL, Kanangat S, Manickan E, Rouse BT. Protection by minigenes: a novel approach of DNA vaccines. *Vaccine.* 1998 Oct;16(17):1660-7.
- Yuan X, Yu X, Lee TH, Essex M. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol.* 1993 Nov;67(11):6387-94.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990 Apr 20;61(2):213-22.
- Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, Burny A, Gallo RC. Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3851-6.
- Zagury JF, Sill A, Blattner W, Lachgar A, Le Buanec H, Richardson M, Rappaport J, Hendel H, Bizzini B, Gringeri A, Carcagno M, Criscuolo M, Burny A, Gallo RC, Zagury D. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. *J Hum Virol.* 1998 May-Jun;1(4):282-92.
- Zhang L, He T, Huang Y, Chen Z, Guo Y, Wu S, Kunstman KJ, Brown RC, Phair JP, Neumann AU, Ho DD, Wolinsky SM. Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):9307-12.
- Zhang WH, Hockley DJ, Nermut MV, Morikawa Y, Jones IM. Gag-Gag interactions in the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 p24 capsid antigen are essential for Gag particle assembly. *J Gen Virol.* 1996 Apr;77 (Pt 4):743-51.
- Zhou W, Resh MD. Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8540-8.
- zur Megede J, Chen MC, Doe B, Schaefer M, Greer CE, Selby M, Otten GR, Barnett SW. Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 2000 Mar;74(6):2628-35.

Zybarth G, Krausslich HG, Partin K, Carter C. Proteolytic activity of novel human immunodeficiency virus type 1 proteinase proteins from a precursor with a blocking mutation at the N terminus of the PR domain. *J Virol.* 1994 Jan;68(1):240-50.

Veröffentlichungen

- Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Wolf H, Wagner R. Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10822-6.
- Deml L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, Wolf H, Wagner R. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of dna candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10991-1001.
- Bojak A, Deml L, Wagner R. The past, present and future of HIV-vaccine development: a critical view. *DDT* 2002 Jan;1(7):18-28. review
- Bojak A, Hammer D, Wolf H, Wagner R (2001). Muscle specific versus ubiquitous expression of Gag based HIV-1 DNA vaccines: a comparative analysis. *Vaccine. eingereicht.*
- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Efficiency of a myogenic DNA vaccine is strictly dependent upon cellular localization of HIV-1 Gag. *Vaccine. eingereicht.*
- Bojak A, Neckerman S., Winkel I., Wolf H, Wagner R (2001). A novel approach to DNA vaccine design results in a functionally inactive but highly immunogenic HIV-1 „scrambled“ Tat protein. *J. Virol. eingereicht.*
- Bojak A, Hammer D, Wolf H, Wagner R (2001). Expression, particle budding and Gag and GagPol polyprotein processing is functional in rodent cell lines using Rev-independent synthetic genes. *in Vorbereitung.*
- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Cytotoxic T lymphocyte induction by minigene immunization of mice. *in Vorbereitung.*
- Bojak A, Winkel I, Wolf H, Wagner R (2001). Altering cellular localization of HIV-1 antigens affects immunogenicity in mice. *in Vorbereitung.*
- Deml L, Steck S, Bojak A, Wolf H, Wagner R (2001). Modulatory effects of CpG oligonucleotides on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type –1 (HIV-1) Pr55^{gag} virus-like particles. *in Vorbereitung.*
- Deml L, Hermann V, Bojak A, Wolf H, Wagner R (2001). Human immunodeficiency virus type –1 Pr55gag virus-like particles possess T helper-1 adjuvant properties to increase the immunogenicity of soluble peptides and proteins. *in Vorbereitung.*

Vorträge bei nationalen sowie internationalen Kongressen

- Bieler K, Deml L, Bojak A, Graf M, Wolf H, Wagner R (1999). Einfluß von Modifikaitonen im Kodon-Gebrauch auf die Immunogenität und Sicherheit von DNA-Vakzine Kandidaten am Beispiel des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens Pr55gag. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Bremen.
- Deml L, Steck S, Bojak A, Graf M, Bieler K, Wolf H, Wagner R (2000). Synthetische Nukleinsäuren: Ein neuartiger Ansatz zur Steigerung der Immunogenität aktueller Impfstoffkandidaten. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.
- Bieler K, Lucas T, Bojak A, Deml L, Graf M, Wolf H, Wagner R (2000). Vergleichende Untersuchungen zur Sicherheit , Expression und Immunogenität von Rev-unabhängigen HIV-1 DNA Impfstoffen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Wolf H, Wagner R (2000). Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type-1 gene expression. The 5th European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.
- Bieler K, Lucas T, Bojak A, Deml L, Graf M, Wolf H, Wagner R (2000). Comparative analysis of Rev-independent HIV-1 DNA vaccines regarding safety, expression and immunogenicity. The 5th European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.
- Bojak A, Neckermann S, Wild J, Gigler A, Wolf H, Wagner R (2001) A novel approach of DNA-vaccine design results in functional inactive but highly immunogenic HIV-1 „scrambled“ Tat protein Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Dresden, 2001.
- Deml L., Bojak A, Steck S., Graf M, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Multiple effects of codon usage optimisation on the expression and immunogenicity od DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1. The 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh 2001

Posterpräsentationen bei nationalen sowie internationalen Kongressen

- Deml L, Graf M, Bojak A, Bieler K, Leschonsky B, Wolf H, Wagner R (1998). Novel strategies to improve the safety and immunogenicity of HIV-1 subunit vaccines. 2nd EC biotechnology meeting on vaccinology, Palma de Mallorca.
- Bojak A, Deml L, Graf M, Wolf H, Wagner R (1998). Bedeutung von Spleißstellen und inhibitorischen Sequenzen für die Rev/RRE-abhängige Expression des HIV Gag Polypeptins. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Regensburg.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Wolf H, Wagner R (1999). Die Rev-abhängige Expression von HIV-1 Gag wird reguliert durch cis-aktive inhibitorische Sequenzen und den Hauptspleißdonor. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Bremen.

- Hermann V, Deml L, Bojak A, Wolf H, Wagner R (2000). Virus-ähnliche Partikel verstärken und modulieren die Immunantwort gegenüber integrierten und löslichen HIV Hüllproteinen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Wien.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Wolf H, Wagner R (2000). Die Stabilität, der Kernexport sowie die Expression später HIV-1 RNAs wird beeinflusst durch die konzertierte Aktion multipler cis-aktiver Sequenzen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Wien.
- Deml L, Steck S, Bojak A, Wolf H, Wagner R (2000). Modulatory effects of CpG oligonucleotides on the immunogenicity of actual HIV-1 candidate vaccines. The 5th European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.
- Bojak A, Hammer D, Wolf H, Wagner R (2001). Expression of Pr55^{gag} and Pr160^{gagpol} in rodent cells: implications for multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Dresden.
- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by minigene DNA immunization: immunogenicity and immunodominant effects of HIV-1 epitopes. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Dresden.
- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Targeted expression of HIV-1 Pr55^{gag} and p24 in skeletal muscle by DNA immunization of mice: comparison of tissue-specific promoters and CMV promotor. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Dresden.
- Deml L, Bojak A, Wolf H, Wagner R (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Dresden.
- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by Minigene DNA immunization. The 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh.
- Bojak A, Neckermann S, Gigler A, Wolf H, Wagner R (2001). A novel approach of DNA-vaccine design results in functional inactive but highly immunogenic HIV-1 „scrambled“ Tat protein. The 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh.
- Bojak A, Hammer D, Deml L, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Targeted expression of HIV-1 Pr55^{gag} and p24 in skeletal muscle by DNA immunization of mice. The 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh.

Auszeichnung-Posterpreis

- Bojak A, Wild J, Wolf H, Wagner R (2001). Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by Minigene DNA immunization. The 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh.

Danksagung

PD Dr. Ralf Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, die Finanzierung und Betreuung der Arbeit sowie für die Möglichkeit an internationalen Kongressen teilnehmen und meine Arbeit vorstellen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer möchte ich mich ferner für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Förderung meiner Arbeit sowie für die finanzielle Unterstützung der Kongressbesuche.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ludwig Deml für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung auch „in schwierigen Zeiten“, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Ingrid Winkel, die mir insbesondere im vergangenen Jahr eine enorme Hilfe war, möchte ich mich für ihre außerordentliche Zuverlässigkeit und ihr bereitwilliges Engagement bedanken.

Diana Hammer und Sandra Neckermann danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen ihrer Diplomarbeiten.

Ein besonderes Dankeschön an alle Arbeitskollegen „der ersten Stunde“ Christina Paulus, Elke Perthen, Ludwig Deml, Bernd Leschonsky, Frank Notka und Volker Reuck sowie meinen „Mitstreitern“ Christine Ludwig, Stephanie Steck, Kurt Bieler und Marcus Graf für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und ihre Kollegialität. Auch den „Neuankömmlingen“ Marion Schuirer, Kerstin Püllmann und insbesondere Jens Wild sowie den nicht namentlich genannten Praktikanten, Diplomanden und Arbeitskollegen der anderen Arbeitsgruppen am Institut möchte ich für das freundliche Arbeitsklima danken.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Tierversuchsanlage H4 für die Aufzucht, Haltung und Pflege der Versuchstiere bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank G.Nchinda. (Prof. Dr. K.Überla; Universität Bochum), der im Rahmen einer Kooperation an einem der Projekte beteiligt war, sowie Dr. R.Schirmbeck (Universität Ulm), Dr. T.Dobner (IMMH, Regensburg), Prof. Dr. med. H.Lochmüller und Dr. N.Larochelle (Genzentrum, München), Dr. H.G.Burgert (Genzentrum, München), Dr. H.Stoiber (Universität, Innsbruck, Österreich), Prof. Dr. B.Ensoli und Dr. A.Cafaro (Inst. of Virology, Rom, Italien) und Dr. G.Sutter (GSF, München) für die Überlassung von Reagenzien und die anregenden Diskussionen.

Lebenslauf

Name Bojak Alexandra, Ines
geboren am 09.08.1972 in Schongau

Anschrift *privat:* Schattenhofergasse 5
D-93047 Regensburg
++49-(0)941-900538

Schulbildung

1979-1983 Grundschole Schongau

1983-1992 Neusprachliches Gymnasium Schongau

Juli, 1992 Abitur mit Wahlfächern Biologie (LK), Deutsch (LK), Englisch (GK) und Ethik (GK);
Notendurchschnitt : 1,9

Studium

Biologie Diplom, Wahlfach: Medizinische Mikrobiologie

1992-1995 Vordiplom, Universität Regensburg

1995-1997 Hauptstudium, Universität Regensburg: Diplomprüfung in den Fächern Medizinische Mikrobiologie, Genetik und Biochemie

1997/1998 Diplomarbeit zum Thema „Bedeutung von Spleißstellen und inhibitorischen Sequenzen bei der Rev/RRE-abhängigen Expression des HIV-1 Pr55^{gag} Proteins“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von PD Dr. R.Wagner

Gesamtnote: sehr gut (1,0)

Promotion

1998-2001 Dissertation zum Thema „Strategien zur Optimierung von DNA-Vakzine Kandidaten gegen das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1)“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von PD Dr. R.Wagner

Fortbildungen

April, 2000 Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §§ 15 und 17 Gentechnikssicherheitsverordnung

August, 2001 „1st Summer School of Immunovirology“ am Institut für Hygiene und Sozialmedizin der Universitätsklinik Innsbruck, Österreich

März, 2002 Kurs "Anwendungen der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik" (Universitätsklinikum Regensburg, Klinische Chemie)